

Doktori /Ph.D. értekezés

Hajdu Anita

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2015

A fitokróm B fotoreceptor szerepe a virágzás fotoperiodikus szabályozásában

Doktori/Ph.D. értekezés

Szerző : Hajdu Anita

Témavezető : Dr. Kozma-Bognár László

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet
Foto- és Kronobiológiai Csoport

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged
2015

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés	8
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1. A cirkadián ritmusok	10
3.2. A növényi cirkadián óra felépítése és jellemzése.....	10
3.2.1. A központi oszcillátor felépítése	13
3.2.2. A bemeneti oldal elemei	16
3.2.3. A kimeneti oldal elemei	21
3.3. A virágzás szabályozása	22
3.3.1. Fotoperiodikus útvonal	22
3.3.2. Vernalizációs útvonal	26
3.3.3. Gibberellin útvonal	27
3.3.4. Autonóm útvonal	27
4. Célkitűzések	28
5. Anyagok és módszerek	29
5.1. Kísérleti anyagok és élőlények.....	29
5.2. Molekuláris biológiai módszerek	32
5.3. Élesztőn alkalmazott eljárások.....	37
5.4. Növényeken alkalmazott eljárások.....	38
6. Eredmények	41
6.1. A phyB túltermelő növények korai virágzás fenotípusa nem a megváltozott cirkadián ritmusnak köszönhető.....	41
6.2. A phyB foszforilációja módosítja az órához vezető vörös fény jelátvitelt	44
6.3. A phyB túltermelő vonalak korai virágzás fenotípusa csak a CO és FT fehérjék jelenlétében nyilvánul meg	

6.4. Az éjszakai <i>FT</i> indukcióhoz szükség van a phyB Pfr formájára.....	52
6.5. A phyB Pfr formája valószínűleg a COP1 aktivitásának gátlásán keresztül szabályozza a CO stabilitását és az <i>FT</i> transzkripcióját.....	55
7. Eredmények értékelése.....	58
7.1. A phyB túltermelése Pfr függő módon fokozza a CO/FT útvonal aktivitását.....	58
7.2. A phyB túltermelése stabilizálja a CO fehérjét azáltal, hogy gátolja a COP1-SPA1 komplex működését.....	61
7.3. A phyB szerepe a cirkadián óra felé közvetített vörös fény bemenet szabályozásában	63
8. Idézett közlemények	65
9. Saját közlemények	73
10. Összefoglalás.....	74
11. Summary.....	80
12. Köszönetnyilvánítás.....	85

1.Rövidítések jegyzéke

AD (activating domain) a GAL4 transzkripció fehérje átirást segítő eleme
AM (*Arabidopsis* medium) növényi táptalaj
BD (binding domain) a GAL4 transzkripció faktor DNS-kötő eleme
bHLH (basic helix-loop-helix) fehérje elem
CTAB cetil-trimetil-ammónium bromid
CSM (complete synthetic medium) élesztő táptalaj
DTT ditiotritol
EDTA etilén-diamin-tetraacetát
FRC (fluence rate curve) egy jelleg függése a fényerősségtől
YEB (yeast beef) *Agrobacterium* táptalaj
YNB (yeast nitrogen base) élesztő táptalaj alkotóeleme
YPAD (yeast pepton adenin dextrose) élesztő táptalaj
LB (Luria – Bertani) baktérium táptalaj
LOV (light/oxygen/voltage) fehérjeelem
MS (Murashige-Skoog)növényi táptalaj
Pfr afitokrómok távoli vörös fényt elnyelő alakja
Pr afitokrómok vörös fényt elnyelő alakja
pPCV (plant cloning vector) növényi bináris (kétagzadás) plazmid
PRC (phase response curve) az óra beállíthatóságát az idő függvényében leíró görbe
SDS (sodium dodecyl sulphate) nátrium-dodecil-szulfát
EE evening element
SER-86 86-os szerin aminosav
Ala alanin aminosav
Asp aszparaginsav aminosav
UV ultraviola sugárzás
BBX (B-box zinc finger) fehérje elem
bZIP (basic leucin zipper) fehérje elem
CCT (CO, CO-like, TOC1) DNS kötő elem
CORE (CO-responsive elements)

Gének nevei

CCA1 CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CCR2 COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED 2
CDF1 CYCLING DOF-FACTOR 1
CO CONSTANS
COP1 CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
CRY CRYPTOCHROME
DET1 DE-ETIOLATED 1
ELF EARLY FLOWERING
FHY FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL
FKF1 FLAVIN-BINDING, KELCH-REPEAT, F-BOX 1
FT FLORAL TRANSITION
GFP GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GI GIGANTEA
LHY LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LIP1 LIGHT INSENSITIVE PERIOD 1
LKP2 LOV KELCH PROTEIN 2
LUC szentjánosbogár luciferáz
LUX LUX ARRHYTHMO
MYB MYELOBLASTOSIS VIRAL ONCOGENE HOMOLOG
PHY PHYTOCHROME
PIF PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR
PRR PSEUDO RESPONSE REGULATOR
TOC1 TIMING OF CAB 1
YFP YELLOW FLUORESCENT PROTEIN
ZTL ZEITLUPE
DBB1 COP1-DET1-DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1
BOA BROTHER OF LUX ARRHYTHMO
REV REVEILLE
LCL5 LHY AND CCA1-LIKE 5
LNK NIGHT LIGHT –INDUCIBLE AND CLOCK REGULATED GENE 1
LWD LIGHT REGULATED WD
CHE CCA1 HIKING EXPEDITION

PRMT5 PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE
SKIP SNW/SKI-INTERACTING-PROTEIN
STIPL1 SPICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS 1
PHOT1 PHOTOTROPIN
UVR8 UV RESISTANCE LOCUS 8
HY5 ELONGATED HYPOCOTYL 5
TSF TWIN SISTER OF FT
SOC1 SUPPRESSOR OF CONSTANS OVEREXPRESSION1
LFY LEAFY
AP1 APETALA
DNF DAY NEUTRAL FLOWERING
FBH FLOWERING BASIC HELIX LOOP HELIX
PFT1 PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1
MSI1 MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1
SPA1 SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A-105 1
HOS1 HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1
PHL PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE FLOWERING
CIB1 CRYPTOCHROME-INTERACTING BASIC-HELIX-LOOP-HELIX
TEM1 TEMPRANILLO
SRR1 SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1
FLC FLOWERING LOCUS C
FRI FRIGIDA
SVP SHORT VEGETATIVE PHASE

2.Bevezetés

Az élőlények egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képesek alkalmazkodni a folyamatosan változó környezethez. Az egyik legjobban prediktálható környezeti változás a nappalok és éjszakák ritmikus váltakozása. A napszakokhoz való alkalmazkodás evolúciós előnye hívta életre a biológiai órákat, amelyek fontos szerepet játszanak a különböző szintű életfolyamatok napszakos, ritmikus szabályozásában. Különösen fontos ez a növények esetében, amelyek helyhez kötött életmódjuk miatt képtelenek a kedvezőtlen körülményeket helyváltoztatással elkerülni. A napi ritmusok többségét irányító biológiai órát a latin *circa* =körül és *diem* = nap szavakból cirkadián órának és az általa létrehozott ritmusokat cirkadián ritmusoknak is nevezzük. Legfontosabb jellemzőjük, hogy ezek a ritmusok állandó körülmények között is fennmaradnak és hőmérsékletkompenzáltak. Ám a tökéletes időzítés érdekében szükség van a biológiai ritmus rendszeres beállítására, környezettel való szinkronizálására, elsősorban a fény és a hőmérséklet által – amelyek a legfontosabb órát beállító környezeti tényezők.

A cirkadián óra szabályzó funkciója révén lehetőség nyílik arra, hogy a szervezet előre jelezze a ciklikusan bekövetkező környezeti változások időpontját, és felkészüljön ezekre az életfolyamatainak időben történő átállításával. *Arabidopsis thaliana* esetén az óra a gének kb. 1/3-át szabályozza, számos transzkripció és poszttranszkripció eseményt időzít a nap egy meghatározott időpontjára. Ez a folyamat megváltoztatja az élőlények érzékenységét és/vagy válaszait a nap folyamán érkező külső jelekre, lehetővé téve ezáltal, hogy a megfelelő időben a megfelelő módon reagáljanak. Ezt nevezzük cirkadián kapuzásnak.

A növények életében a vegetatív állapotból reprodukív állapotba való átkapcsolás igen jelentős és visszafordíthatatlan folyamat, ezért nagyon fontos annak pontos időzítése. A növények virágzásának ideje számos környezeti tényezőtől függhet. Ilyen a hőmérséklet, a fény mennyisége és minősége, vagy a nappal hosszúságának változása. Ezek közül a nappal hosszúságának a változása a legmegbízhatóbb, hiszen ez rendszeres és megjósolható ciklusokban történik. A fotoperiodizmus magában foglalja azokat a biológia folyamatokat, amelyeket a nappal hosszúságának változása szabályoz. A fotoperiodizmus jelensége megtalálható az állatoknál is, ahol a nappal hosszúsága szabályoz számos időszakos aktivitást, mint a téli álm, téli és nyári kültakaró váltása, vagy a reprodukciós aktivitás.

A virágzás fényperiódushoz kapcsolódó időzítése szempontjából megkülönböztetünk hosszú- (lúdfű, árpa) és rövidnappalos (rizs, cirok, krizantém), valamint a nappal hosszúsága szempontjából neutrális növényeket (tök, paradicsom, rózsza). Ezekben az esetekben a virágzás csak (illetve leginkább csak) akkor indul meg, ha a nappalok kellően hosszúak illetve kellően rövidek. Pontosabban, a rövidnappalos növények akkor virágoznak, ha az éjszaka hossza elér egy kritikus szintet, a hosszúnappalos növények pedig akkor, ha egy kritikus szintnél rövidebb az éjszaka. Vannak speciális igényű növények is. Ilyen például a cukornád egyik fajtája, amelyik csak akkor virágzik, ha a megvilágítás időtartama 12 és 14 óra közé esik. Mások, mint a hibiszkusz viszont csak ilyen körülmények között nem virágoznak, hosszabb vagy rövidebb megvilágítás esetén igen (ambifotoperiódusos növények).

Számos modell megszületett már, amivel magyarázni próbálták hogyan jut el a fotoperiodikus információ az egyedfejlődési fázisátmenet szabályozásáig. Közülük a külső egybeesés (Bünning 1936) modell a leginkább összeegyeztethető genetikai bizonyítékokkal. A modell szerint cirkadián ritmusa van a fotoperiodikus fényérzékenységeknek is: a nap első fele fényre érzéketlen, míg a második fele fényérzékeny időszak. A tavasszal hosszabbodó nappalok miatt a fény egyre inkább jelen van a fényérzékeny időszakban, mely fotoperiodikus válaszokat eredményez. Ebben a modellben két igen fontos szerepe van a fénynek: az egyik a cirkadián óra beállítása, hogy biztosítsa a kulcs elemek napi ritmusát, a másik funkció pedig ezen elemek aktivitásának szabályozása. Csak akkor alakulnak ki a válaszok, amikor a szabályzó elemek szintje a fény jelenlétében elér egy küszöbértéket.

A belső koincidencia modell (Pittendrigh 1966) szerint a fénynek csupán egy szerepe van, az pedig a cirkadián óra beállítása. E modell szerint legalább két különböző belső ritmusnak kell azonos fázisba kerülnie egymással ahhoz, hogy a fotoperiodikus válaszok létre jöhessenek.

A nappalok és éjszakák váltakozásának érzékelésében éppúgy, mint a cirkadián óra külső környezettel való szinkronizálásában, fényérzékeny fehérjék vesznek részt, melyek ezáltal szerepet játszanak a virágzás optimális időzítésében is. Ezek a fehérjék a vörös/távoli vörös fény érzékelésére képes fitokrómok (phyA-E), az UV-A és a kék fény hullámhossz tartományában elnyelő kriptokrómok (CRY1 és CRY2), és ZTL család tagjai valamint az UV-B sugárzás érzékelésére képes UVR8 receptor.

Munkánk során a phyB fotoreceptor virágzásban betöltött szerepét vizsgáltuk *Arabidopsis thaliana* növényben.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A cirkadián ritmusok

A cirkadián ritmusok rendelkeznek néhány olyan vonással, amely megkülönbözteti őket az egyéb biológiai ritmusoktól (Edmunds 1988).

a, *Megközelítőleg 24 órás periódus*

Ciklikusan változó körülmények között a cirkadián óra periódushossza megegyezik a külső környezet periódushosszával. Ilyenkor a külső tényezők ritmikus változásai vezérlik az óra oszcillációját. Állandó körülmények között, amikor az óra „szabadon fut”, kialakul a cirkadián ritmusokra jellemző saját periódushossz, amely csak körülbelül lesz 24 h.

b, *Beállíthatóság*

A cirkadián ritmusok akkor igazán hasznosak az élőlények számára, ha kapcsolatban állnak a valós idővel. A beállítás az a folyamat, amelynek során az óra összhangba kerül a külső környezettel. A legfontosabb beállító tényezők a fény/sötét, valamint a hideg/meleg ciklusok váltakozásai, azaz a hőmérséklet és a fény.

c, *Állandó körülmények között is fennmaradnak*

d, *Hőmérséklet kompenzáció*

A Q10 érték, a biokémiai folyamatok jellemzésére alkalmazott paraméter. Azt mutatja, hogy hányszorosára változik egy folyamat sebessége, ha a hőmérsékletet 10 °C-kal megemeljük. A biokémiai folyamatok Q10 értéke általában 2-2,5. A cirkadián óra periódushossza ezzel szemben alig változik a hőmérséklet emelésével ($Q_{10}=0,8-1,2$).

Ezt nevezzük hőmérséklet kompenzációnak.

3.2. A növényi cirkadián óra felépítése, jellemzése

A cirkadián ritmusok létrehozásában, felépítésében és fenntartásában szerepet játszó belső időmérő mechanizmus a cirkadián óra.

A cirkadián óra működésének alapja egy endogén, önfenntartó negatív visszacsatolás, amelyet pozitívan és negatívan ható fehérjék kölcsönös, transzkripció és transláció szintű szabályozása működtet. A megközelítőleg 24 órás ritmus fenntartása érdekében több ponton késleltetés található az óra rendszerében. Ezek poszt-transzlációs mechanizmusok, amelyek az óra fehérjék aktivitását, degradációját ill.

kompartmentalizációját szabályozzák. Ilyen például az óra fehérjék foszforilációja, amely általában a komponensek degradációjának elősegítése révén késlelteti azok felhalmozódását.

A cirkadián óra 3 fő funkcionális egységre osztható (1. ábra) (Merrow és mtsai 1997, Johnson és mtsai 1998):

a, *bemeneti oldal (input)*

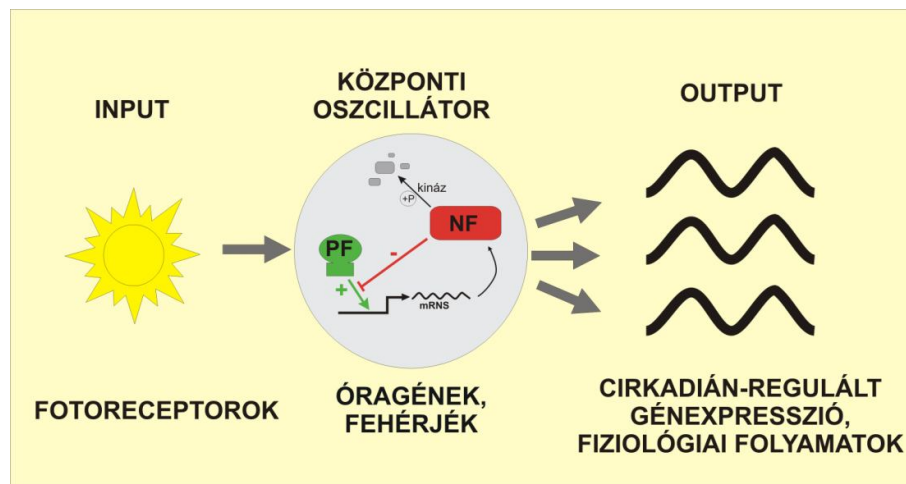
Az óra beállításáért felelős rész, amely a szinkronizáló jeleket (fény, hőmérséklet) továbbítja az óra felé.

b, *központi oszcillátor*

Az óra szíve, amelynek elemei negatív visszacsatolások révén szabályozzák önmaguk és egymás működését.

c, *kimeneti oldal (output)*

Magában foglalja mindazon folyamatokat, amikre az óra hatással van.



1. ábra A cirkadián óra vázlatos szerkezete.

Az eukarióta cirkadián órák esetében a központi oszcillátor általános működési mechanizmusa egy önfenntartó negatív visszacsatolás: a pozitív faktor (PF) indukálja a negatív faktort (NF) kódoló gén átírását, a lassan emelkedő mennyiségű NF pedig idővel gátolja a PF aktiváló hatását. Így a NF mennyisége csökkenni kezd, ezzel egy újabb ciklus veszi kezdetét. A NF felhalmozódását foszforiláció és azt követő degradáció késlelteti (kináz, +P). Az oszcillátor által generált ritmikus jel egy több ágon futó jelátviteli láncon keresztül szabályozza az output elemek ritmikus működését. Az oszcillátor ritmusának fázisát a környezeti paraméterek (fény, hőmérséklet) periodikus váltakozása állítja be (input).

A cirkadián ritmusok jellemzésére használt fogalmak:

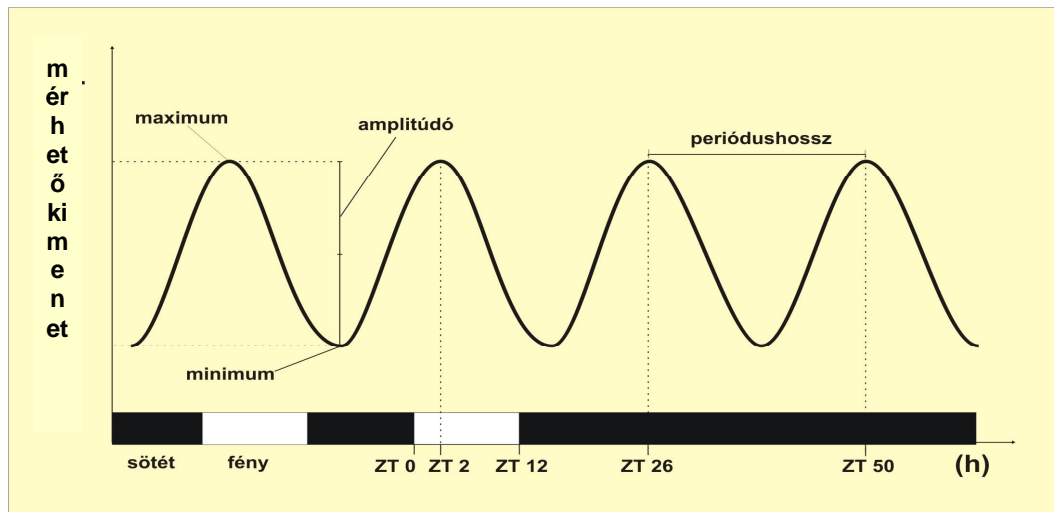
Periódus: a görbe két azonos pontjának a távolsága időben (pl: két egymást követő maximum távolsága). Ez kb. 24 h a cirkadián ritmusok esetén.

Amplitúdó: a maximum és a minimum érték különbségének a fele.

ZT (zeitgeber time): az órát beállító utolsó szignál óta eltelt idő órákban kifejezve. Általában ez a jel a fény, így ZT0 az utolsó sötét-fény átmenet (hajnal) időpontja.

Szubjektív nappal/éjszaka: állandó körülmények között az az időtartam, ami az órát beállító ciklusoknak megfelelően a belső óra által jelzett nappal/éjszaka időszakának felel meg.

Fázis: a ritmikus folyamatot leíró görbe egy jellegzetes pontjának (általában a maximum értéknek) a viszonya az időhöz órákban kifejezve.



2.ábra. Egy cirkadián óra által szabályozott folyamat jelleggörbéje.

Az ábrán egy cirkadián óra által regulált gén kifejeződésének mértékét (az adott időpontban a génről átíródott mRNS-molekulák mennyiségét) tüntettük fel az idő függvényében. A vizsgálat ideje alatt uralkodó fényviszonyokat fekete (sötét), ill. fehér (fény) sávokkal jelöltük az időtengely mentén. Látható, hogy a gén kifejeződése minden nap a fény bekapcsolása után kb. 2 órával éri el maximumát (vagyis a ritmus fázisa ZT2). A váltakozó sötét/fény körülmények mellett tapasztalt oszcilláció azután is folytatódik kb. 24 órás periódusokkal, hogy a rendszert a megfigyelés második napjának végétől állandó sötétbe helyeztük; szemléltetve a cirkadián ritmusok legmarkánsabb diagnosztikai jegyét. (A fogalmak magyarázatát l. a szövegben.)

Biológiai órával a legtöbb ciklikus körülmények között élő szervezet rendelkezik, a mikroorganizmusoktól az emberig. Ugyan a cirkadián óra működésének tényét először növényekben írták le (Mairan 1729), mégis igen sok információt ismerünk kékbaktériumok, gombák, ecetmuslica és az egér rendszeréből. A bakteriális cirkadián óra működésének alapja az órafahérjék ritmikus foszforilációja. Ezzel szemben az eukarióta szervezetek óráját az óragének/órafahérjék ritmikus kifejeződése működteti.

Bár az oszcilláció kialakításának mechanizmusát tekintve a növényi óra nagyon hasonlít a *muslica*, vagy akár az egér cirkadián órájához, a növényi óragének/órafehérjék semmiféle (szerkezeti) hasonlóságot nem mutatnak az állati rendszerek órakomponenseihez.

Az *Arabidopsis thaliana* óramodellje referenciaként szolgál egyéb növényi órák megismeréséhez (Mclung 2013, Staiger és mtsai 2013).

3.2.1. A központi oszcillátor felépítése

Transzkripció szabályozás:

Reggeli fázisú komponensek (CCA1, LHY)

A CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) és a LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) két rokon MYB-szerű transzkripció faktor. Fizikailag kölcsönhatnak egymással, transzkript és fehérje szintjük a hajnali órákban a legmagasabb (Lu és mtsai 2009, Yakir és mtsai 2009). Gátolják az esti fázisú *TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1)* másnéven *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1 (PRR1)* kifejeződését azáltal, hogy kötődnek a *TOC1* promóter ún. „evening element” (EE) motívumához. (Harmer és mtsai 2000, Alabadi és mtsai 2001). Ebben a gátlásban szerepet játszik egy ko-represszor komplex (CDD komplex) is: a CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 10 (COP10), a DE-ETIOLATED1 (DET1) – a fotomorfogenezis kulcsfontosságú represszora - és a COP1-DET1-DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 (DBB1) együttese (Lau és mtsai 2011). A CCA1 és LHY a *TOC1* mellett számos egyéb esti gén gátlásában szerepet játszik a DET1 fehérje közreműködésével. Ezek a : *GIGANTEA (GI)*, *LUX ARRHYTHMO (LUX)*, *BROTHER OF LUX ARRHYTHMO (BOA vagy NOX)*, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* és *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* (Dai és mtsai 2011, Lu és mtsai 2012, Nagel és Kay 2012). A CCA1 és LHY nem csak negatív, hanem pozitív szabályozásban is részt vesz: aktivátorai a *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7* és *9* elemeknek.

Nappali fázisú komponensek

A *TOC1/PRR1* fehérje tagja a *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)* családnak, amelynek tagjai a nap folyamán egymás után sorban mutatnak kifejeződési maximumot: reggel a *PRR9*, majd a *PRR7*, *PRR5* és a sort a *TOC1* zárja, amelynek alkonyat

környékén van az expressziós csúcsa (Farre és Liu 2013). A TOC1, PRR5, PRR7 és PRR9 gátolják a *CCA1* és *LHY* kifejeződését a nap folyamán a TOPLESS/TOPLESS RELATED család fehérjéivel együttműködve (Nakamichi és mtsai 2010, Wang és mtsai 2013). Ezen kívül represszorai a REVEILLE8 (REV8) másnéven LHY AND CCA1-LIKE 5 (LCL5) fehérjének, ami indukálja a *PRR5* és *TOC1* gének expresszióját (Nakamichi és mtsai 2012, Rawat és mtsai 2011, Farinas és Mas 2011). A nappal közepén mutatnak kifejeződési maximumot egy cirkadián óra által szabályozott és fény indukált kis géncsalád fehérjéi, a NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK REGULATED GENE 1 és 2 (LNK1 és LNK2). Szerepük van a *PRR5* és *ELF4* pozitív szabályozásában (Rugnone és mtsai 2013). A LIGHT-REGULATED WD1 (LWD1) és LWD2 szintén pozitívan szabályozzák a *PRR9*, *PRR7*, és *PRR5* kifejeződését (Wang és mtsai 2011).

Esti fázisú komponensek

A CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE) a TOC1 fehérjével kölcsönhatva segít gátolni a *CCA1* kifejeződését (Pruneda-Paz és mtsai 2009). A LUX – egy Myb-szerű transzkripciós faktor-, az ELF3 és az ELF4 mind este mutatnak expressziós maximumot, kölcsönhatásuk révén alakul ki az ún. „evening complex”. Ezt a komplexet a CCA1 és LHY negatívan szabályozza, míg maga a komplex gátolja a *PRR1*, *PRR5*, *PRR7* és *PRR9* kifejeződését, ezáltal enyhíti ezek gátló hatását a *CCA1* és *LHY* gének tekintetében (Dixon és mtsai 2011, Herrero és mtsai 2012, Nusinow és mtsai 2011).

A TOC1 szabályozásában említett, a promóterben található „evening element” (EE) a cirkadián óra esszenciális szabályzó eleme. Az óra komponensek vagy kapcsolódnak az EE-hez és szabályozzák az adott gén transzkripcióját (a CCA1 és LHY negatívan, az RVE4, RVE6 és RVE8 pozitívan) (Nagel és Kay 2012, Rawat és mtsai 2011, Hsu és mtsai 2013, Huang és mtsai 2012), vagy szabályozottak más órafehérjék által a promótereikben található EE-n keresztül (*PRR5*, *PRR9*, *TOC1*, *LUX*, *ELF4* és *GI*) (Nagel és Kay 2012, Rawat és mtsai 2011, Hsu és mtsai 2013).

Ez az óra komponensek közötti reciprok szabályozás biztosítja az óragének rendezett expresszióját, amely az alapját képezi egy komplex, összekapcsolódó és oszcilláló genetikai hálózatnak.

Poszttranszkripció szabályozás:

Ide tartozik a számos óragént érintő alternatív splicing folyamata. A PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5 (PRMT5) szabályozza a *PRR9* alternatív splicingját, feltételezhetően a splicing faktorok metilációján keresztül (Hong és mtsai 2010, Sanchez és mtsai 2010). A splicoszóma komponens SNW/SKI-INTERACTING PROTEIN (SKIP) szintén számos óragén mRNS érési folyamatában játszik szerepet. Ahogy a SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1 (STIPL1) is, amely a splicoszómák szétszerelésében fontos fehérje (Baudry és mtsai 2010).

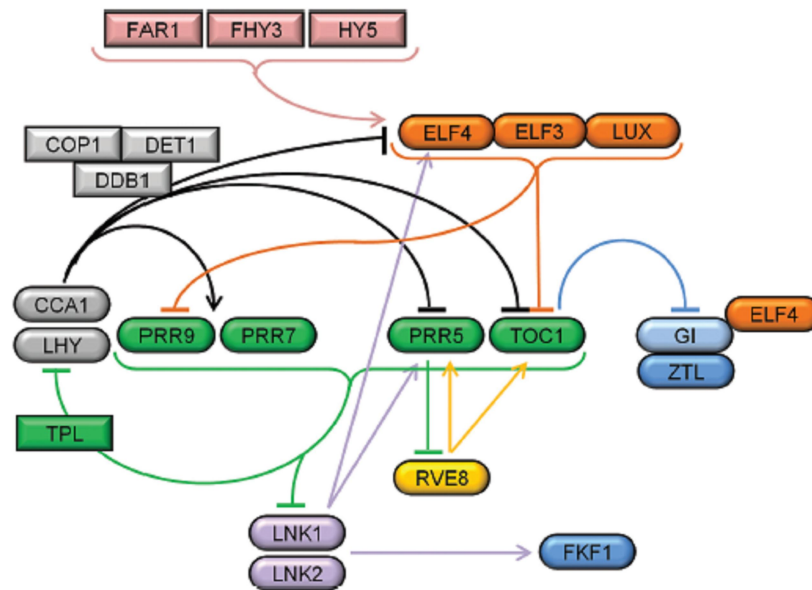
Poszttranszlációs szabályozás:

Számos óra komponensről ismeretes, hogy a más fehérjékkel történő kölcsönhatásuk elengedhetetlen ahhoz, hogy szabályzó funkciójukat betöltsék. Ilyen a már említett CCA1 és LHY kölcsönhatása a DET1 fehérjével, hogy negatívan szabályozzanak esti fázisú elemeket. Ehhez hasonló a *PRR9*, *PRR7* és *PRR5* kölcsönhatása a TOPLESS fehérjével, hogy gátolják a *CCA1* és *LHY* expressziót.

A fehérje –fehérje kölcsönhatásokon túl fontos szerepe van az óra működésében egyes órafehérjék szabályozott degradációjának. Ennek kulcs fehérjéje a növényekben a ZEITLUPE (ZTL).

A ZTL együtt két homológ fehérjével- FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX (FKF1) és LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) – a TOC1 és *PRR5* óra elemekkel kölcsönhatva proteoszómás degradációra ítélik azokat (Baudry és mtsai 2010, Mas és mtsai 2003). A *PRR5* szintén kölcsönhat a TOC1 fehérjével, fokozza annak sejtmagi felhalmozódását, megakadályozva ezzel a TOC1 citoplazmában történő degradációját (Wang és mtsai 2010).

A GI fényfüggő (kék) módon interakcióba lép a ZTL fehérjével, ezáltal stabilizálja azt, míg a ZTL is szabályozza a GI stabilitását a citoplazmában, valamint a sejtmag és citoplazma közötti megoszlását is (Kim és mtsai 2013). A CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) és ELF3 proteinek kölcsönhatása a GI fehérjével pedig elősegíti a GI sejtmagi degradációját (Yu és mtsai 2008). Az órafehérjék stabilitására egyéb poszttranszlációs módosítások is hatással vannak, amelyek közül legismertebb a foszforiláció. Megfigyelhető, hogy a degradációt megelőzően megnő a foszforiláció mértéke valamennyi *PRR* fehérje esetében (Fujiwara és mtsai 2008).



3. ábra. Az Arabidopsis cirkadián óra vázlatos modellje

Az ovális elemek az óra komponenseket, a négyszögek pedig járulékos elemeket jelölnek. Nyíl jelzi az aktivációt, a tompa végű nyíllal pedig a repressziót ábrázoltuk. Az összekapcsolt oválisok vagy négyszögek fehérje – fehérje kölcsönhatást mutatnak. (Johansson és Staiger 2014)

3.2.2. A bemeneti oldal elemei

A cirkadián óra tökéletes működéséhez azonos fázisban kell lennie a valós idővel. A szabadon futó cirkadián ritmusok periódusa nem pontosan 24 h, ezért a szétcsúszás elkerülése érdekében az órát naponta hozzá kell állítani a külső időhöz.

A központi oszcillátor környezettel való szinkronizációja a bemeneti oldal elemein keresztül valósul meg. Ezek érzékelik a környezetből érkező jeleket, melyek közül a fény és a hőmérséklet a két legfontosabb beállító tényező. A fény számos módon hatással van az óra elemeire (transzkripció, mRNS és protein stabilitás), néhány óra komponens pedig szerepet játszik a fény input szabályozásában (Fankhauser és mtsai 2002). A fény érzékelését fotoreceptorok végzik, melyekről az információ a jelátviteli hálózaton keresztül jut el a cirkadián óráig.

A fotoreceptor fehérjék a fényt a hozzájuk kapcsolt jellegzetes festékmolekulák segítségével nyelik el. Ezen molekulák fényelnyelés által kiváltott szerkezetváltozása a fotoreceptorok átalakulását is eredményezi, ami elindítja a jelátvitelt. Az elnyelt fény hullámhossza alapján a fotoreceptorokat a következő csoportokba sorolhatjuk:

1. A vörös/távols vörös fényt érzékelő fitokrómok (Liu és Sharrock 2013, Franklin és Quail 2009, Clack és mtsai 2009, Kevei és mtsai 2007)

2. Az UV-A és kék tartományban elnyelő kriptokrómok, fototropinok és a ZTL–család tagjai (Ahmad és Cashmore 1993, Liu és mtsai 2011, Christie és mtsai 2014, Liu és mtsai 2011, Takase és mtsai 2011)
3. Az UV-B érzékelő molekulák (Feher és mtsai 2011)

A fitokrómok speciális, 125 kDa molekulatömegű, hisztidin kináz-szerű fényérzékelő fehérjék, amelyekhez tetrapirrol természetű fitokromobilin festékmolekula kötődik kovalensen (kromofór). A festékmolekula fényelnyelési tulajdonságainak köszönhetően a fitokrómoknak két alakjuk van: a vörös fényt ($\lambda_{\max}=660$ nm) elnyelő inaktív (Pr) forma, ill. a távoli vörös fényt ($\lambda_{\max}=730$ nm) elnyelő aktív forma (Pfr). A biológiailag aktív forma lehet jelátviteli utak kiindulópontja. A fitokrómok a sejtben Pr formában képződnek, majd vörös fény elnyelésekor alakulnak át Pfr formába. Ez a forma távoli vörös fény elnyelése által alakul vissza Pr állapotba, amely átalakulás idővel magától is megtörténik fénytől függetlenül (sötét reverzió).

Fontos megemlíteni a munkánk szempontjából, hogy a phyB Ser-86 aminosav foszforilációja hatással van a phyB Pfr formájának a sötét reverziójára. Ennek az aminosavnak a cseréje Ala (nem foszforilálódó – phyB[S86A]) vagy Asp (folyamatos foszforiláltságot imitáló – phyB[S86D]) aminosavra jelentősen megváltoztatta a phyB sötét reverzióját, így a vörös fény indukált jelátvitelt is. A fotoreceptor fényelnyelési és fotokonverziós tulajdonságai nem változtak a mutációval. A foszfomutánsok fenotípusa olyan körülmények között kifejezettebb, ahol a phyB Pfr formája viszonylag alacsony mennyiségben van jelen. Ilyen az alacsony intenzitású vörös fény (alacsony Pr→Pfr fotokonverziós ráta) valamint az árnyék esete (magas Pfr→Pr fotokonverziós ráta). A phyB[S86D] foszfomutáns folyamatos foszforiláltságot utánzó állapota sokkal gyorsabb, míg a phyB[S86A] esetében pedig a foszforiláció hiánya sokkal lassabb reverziót okoz, ami végső soron az aktív Pfr forma alacsony, ill. magas szintjéhez vezet (Medzihradzsky és mtsai 2013).

Ismeretesek olyan phyB mutációk is, amelyek konstitutív módon változtatják meg a Pr/Pfr formák arányát. A phyB(Tyr276His) egy folyamatosan aktív változata a phyB fotoreceptornak, állandóan Pfr formában van, függetlenül a fényviszonyoktól. (Su és Lagarias 2007). A phyB(Cys357Thr) egy kromofór kötésére (így fény elnyelésre) képtelen mutáns, amely mindig Pr állapotú-függetlenül a fényviszonyoktól (Clack és mtsai 2009).

A fitokrómok sötétben a citoplazmában helyezkednek el, fény hatására a sejtmagba vándorolnak, ahol transzkripciós faktorok segítségével fényfüggő gének kifejeződését szabályozzák (Kevei és mtsai 2007). A fitokrómokat Arabidopsisban 5 gén kódolja: *PHYA*, *-B*, *-C*, *-D* és *-E*. Működésük alapján két csoportba sorolhatók. Az I. típusba tartozik a *phyA*, amelynek jellemzője, hogy a Pfr forma igen instabil fehérje, fényben gyorsan lebomlik. Szerepe így főleg a csírázás megindításában és nagyon gyenge fényben a zöldülés szabályozásában van. A II. típusba tartozik az összes többi fitokróm (*phyB-E*). Ezek stabilabb fehérjék, szerepük főleg a zöldülés folyamatának, a szár megnyúlásának, az árnyékkerülés és a virágzás szabályozásában van. A fitokrómok funkciójukat dimer formában töltik be. Míg a *phyA* csak homodimereket képez, addig a II típusú fitokrómok homo-és heterodimerek képzésére is képesek (Liu és Sharrock 2013).

A kriptokrómok voltak az első molekulárisan is azonosított növényi kék fény receptorok (Ahmad és Cashmore 1993). Arabidopsisban három gén kódolja a kriptokrómokat: *CRY1*, *CRY2* és *CRY3*. A *CRY1* és 2 elsősorban a sejtmagban található. Kék fény hatására a festékkötő elem szerkezetváltozása következtében a molekula foszforilálódik (Liu és mtsai 2011). Míg a *CRY2* foszforilálódás után ubikvitinálódik és lebomlik, addig a *CRY1* fehérje szintje nem változik. Így a *CRY2* fehérjének gyenge, a *CRY1* – nek inkább erősebb fényben fontosabb a szerepe.

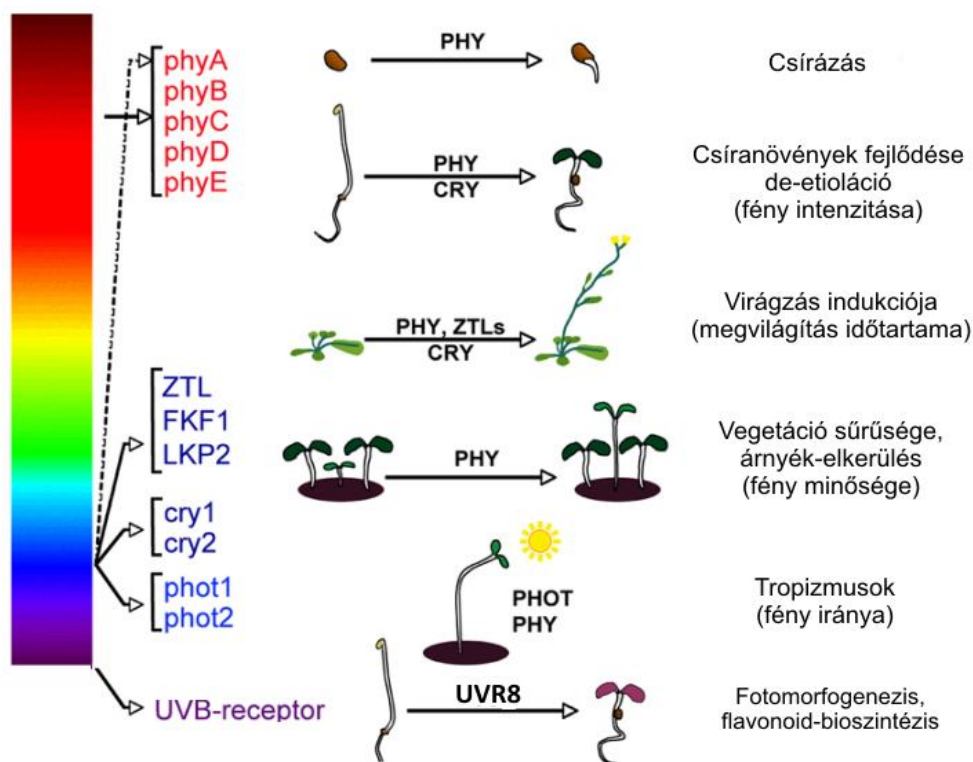
A *CRY1* és 2 fotoreceptor szerepet játszik a növényi növekedés és fejlődés számos pontján (a zöldülés kék fény általi szabályozása, a virágzás fotoperiodikus szabályozása, a cirkadián óra beállítása, gyökérnövekedés, apikális dominancia, árnyékelkerülés, bakteriális és virális patogénekre adott válasz).

A *CRY3* a mitokondriumban és a kloroplasztisban is található. DNS javító és fényérzékelő aktivitással egyaránt rendelkező DNS fotoliáz (Liu és mtsai 2011).

A fototropinok fény aktivált szerin/treonin kinázok, melyek kék fény hatására autofoszforilálódnak. Arabidopsisban 2 fototropin található: *PHOT1* és *PHOT2*. Ezek számos fényválaszt szabályoznak, amelyeknek a fotoszintézis hatékonyságának optimalizálásában és a sejtmegnyúlás gyenge fényben történő indukciójában van szerepük. Mindkettő fototropin a plazmamembrán intracelluláris oldalához kapcsolódik. C terminális végükön található a szerin/treonin kináz elem, az N terminális részen pedig két speciális LOV („light, oxygen or voltage”) elem. A *LOV1* és *LOV2* domén szerepe a kromofór kötése és a kék fény érzékelése (Liu és mtsai 2011).

A fototropinokon kívül számos egyéb LOV doménnel rendelkező fotoreceptor található Arabidopsisban. A ZTL család tagjai (ZTL, FKF1, LKP2) fontos szerepet játszanak a cirkadián óra szabályozásában részt vevő fehérjék stabilitásának és fényfüggő degradációjának irányításában, valamint a virágzás fotoperiodikus regulációjában (Takase és mtsai 2011). A fehérjék N terminális részén található a LOV domén, majd egy F-box elem és végül a C terminális részen 6 kelch ismétlődés. Az F-box elemhez egy E3 ubikvitin ligáz kapcsolódik, mely lebontásra jelöli ki a célfehérjéket az ubikvitin-proteoszóma rendszer segítségével. A kelch ismétlődések fehérje-fehérje kapcsolatok által kötik a lebontandó fehérjéket, de szerepet játszanak a ZTL család egyes tagjai közötti heterodimerizációban is.

A cirkadián óra beállító jelként képes érzékelni a nem károsító hatású UV-B fényt is (Fehér és mtsai 2011). A folyamatban szerepet játszik az UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) UV-B fotoreceptor és a COP1 fehérje is. Az UVR8 a növényekben homodimerként előforduló fehérje, mely az UV-B fényt specifikus helyzetű triptofán aminosavakon keresztül érzékeli, és ellentétben a fitokrómokkal vagy kriptokrómokkal, jellegzetes kromofórt nem köt (Rizzini és mtsai 2011). A receptor UV-B fény hatására gyorsan monomerizálódik és a sejtmagba vándorol, ahol kölcsönhat a COP1 fehérjével, és közvetlenül vagy közvetve szabályozza az UV-B indukált gének kifejeződését (Favory és mtsai 2009). Ilyen például az *ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5)*, amelynek promóter régiójához kapcsolódik az UVR8 (Cloix és Jenkins 2008). A cirkadián óra periódusa UV-B hatására intenzitástól függő módon rövidül, akárcsak látható fény esetén. A meghatározott időben adott UV-B pulzusokkal a cirkadián óra fázisa megváltoztatható a szubjektív éjszaka folyamán. Az óra UV-B általi beállítása az óragének transzkripciók aktiválásán keresztül történik. A cirkadián óra maga is visszahat az UV-B fénnel indukált génekre az ún. kapuzási mechanizmus segítségével (Fehér és mtsai 2011).



4. ábra. Az *Arabidopsis thaliana* fotoreceptorai

A távoli vörös és vörös fény elnyeléséért a fitokrómok (phyA-E) felelősek, melyek így fontos szerepet játszanak a csírázás, a zöldülés, a virágzás indukció, árnyék-elkerülés folyamatában. A kék fény elnyelésében a kriptokrómok (CRY1-2), fototropinok (PHOT1-2), valamint a ZTL család tagjai (ZTL, FKF1, LKP2) vesznek részt, amelyek a növényi fejlődés számos pontján játszanak szerepet. Az UV-B érzékelésére képes UVR8 fontos szerepet tölt be a fotomorfogenezisben és a flavonoid-bioszintézisben.

Számos kutatást végeztek annak érdekében, hogy felderítsék a fotoreceptorok és a cirkadián óra központi eleme közötti kapcsolatokat. Fényaktivációt követően a fitokrómok a sejtmagba vándorolnak, ahol úgynevezett sejtmagi testeket formálnak. Ezek pontos funkciója még nem ismert, de valószínű, hogy multiprotein komplexek, melyekben a fitokrómok kölcsönhatnak transzkripciós faktorokkal és egyéb szabályzó fehérjékkel, hogy irányítsák fényindukált gének expresszióját. Az első ilyen kölcsönható fehérje, amit azonosítottak a PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3). A PIF3 egy bHLH (basic helix-loop-helix) transzkripciós faktor család tagja. A PIF-ek szabályozzák számos olyan gén transzkripcióját, amelyek a fény megjelenését követően 1 órán belül indukálódnak, valamint negatívan szabályozzák a phyB mennyiségét folyamatos vörös fényben. Mivel a PIF3 és PIF5 hiánya nem érinti

az óra beállíthatóságát, valószínű, hogy nem a PIF-ek a terminális elemei a fitokrómok által az óra felé közvetített vörös fény bemenetnek (Castillon és mtsai 2007).

A COP1 egy másik szabályzó fehérje, amelyik kölcsönhat a fitokrómokkal a sejtmagban. Sötétben, mint E3 ubikvitin ligáz a fény jelátvitelben központi szerepet játszó transzkripció faktorok degradációját kezdeményezi, és ez által represszálja a fényregulált géneket. A nappal során a fitokrómok gátolják a COP1 működését, amely lehetővé teszi transzkripció faktorok sejtmagi felhalmozódását és a fényindukált gének transzkripcióját (pl.: *LHY*, *CCA1*)(Ma és mtsai 2002). Akék fénnel aktivált CRY1 is képes kölcsönhatni a COP1 fehérjével, ezáltal gátolni annak funkcióját (Wang és mtsai 2001, Li and Yang 2007).

Néhány eredmény már azt is bizonyította, hogy a kék és vörös fény receptorok között funkcionális és fizikai kölcsönhatás van. A CRY1 -fényaktivált állapotától függetlenül - szükséges a phyA általi vörös fény jelátvitelhez (Devlin és Kay 2000). Míg a CRY2 teljes funkciójához a phyB fényaktivált formája (Pfr) esszenciális (Mas és mtsai 2000).

A FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1 (FAR1), a FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3 (FHY3) és a HY5 transzkripció faktorok fontos pozitív szerepet játszanak számos fényindukált gén transzkripciójának szabályozásában. Kimutatták, hogy ezek a faktorok képesek kötődni az *ELF4* gén promóterének különböző szakaszaihoz, ami szükséges az *ELF4* fényindukált kifejeződéséhez (Li és mtsai 2011).

3.2.3. A kimeneti oldal elemei

Számos élettani és növekedési folyamat mutat napi ritmust, amelyek gyakran a cirkadián óra szabályozása alatt állnak - ahogy az *Arabidopsis* génjeinek kb. egyharmada (Nozue és mtsai 2007). A kimeneti oldal elemei közé tartozik mindaz, amire az oszcillátor hatást gyakorol. Ide tartoznak az óra által szabályozott gének, biokémiai és fiziológiai folyamatok. Ilyen folyamat például az elsődleges metabolizmus, a fotoszintézis, a növekedés szabályozása, hormonális szabályozás, tápanyagfelvétel, virágzás indukció. A cirkadián óra biztosítja, hogy ezek a folyamatok a maximális hatékonyság érdekében a legoptimálisabb napszakban, vagy a fotoperiodikus virágzás esetében az év legmegfelelőbb időszakára legyenek időzítve.

Példaként említeném a hipokotil megnyúlás szabályozását, melyet a cirkadián óra és számos külső szignál egyaránt befolyásol (Nozue és mtsai 2007). A PIF4 és PIF5 óra regulált transzkripció faktorok, úgy azonosították őket, mint az *Arabidopsis thaliana* hipokotil növekedésének kulcs fontosságú elemei. Az „evening complex” (LUX, ELF3

és ELF4) az esti órákban gátolja a *PIF4* és *PIF5* transzkripcióját, azáltal hogy a LUX fehérje hozzákapcsolódik a promóterükhöz. *PIF4* és *PIF5* hiányában lassul a hipokotil megnyúlás a kora esti órákban, de az éjszaka folyamán, ahogy gyengül a gátló hatás és emelkedik a *PIF4/PIF5* szintje, a hipokotil elongáció megindul. *AphyB* elősegíti a *PIF4* és *PIF5* degradációját vörös fényben, míg a magas szacharóz koncentráció stabilizálja a *PIF5* fehérjét (Nusinow és mtsai 2011, Lu és mtsai 2013). Mindezen hatások eredményeképpen a *PIF4* és *PIF5* fehérjék szintje (így a megnyúlás sebessége is) az éjszaka legvégén éri el maximumát. Ez azért hasznos, mert a megnyúláshoz vízre van szükség, ami leginkább a hajnali órákban elérhető és az alacsonyabb hőmérséklet miatt leginkább hasznosítható.

3.3. A virágzás szabályozása *Arabidopsis*ban

A növények jelentős fiziológiai változáson mennek keresztül, mikor a vegetatív növekedésből reproduktív fejlődésre, virágképzésre váltanak. Ez a váltás különböző külső és belső jelekre adott válaszok eredménye. Négy genetikailag meghatározott útvonalat azonosítottak, amelyek szerepet játszanak a virágzás szabályozásában (Srikanth és Schmid 2011).

3.3.1. Fotoperiodikus útvonal

Sok növény esetén a nappalok hosszúsága (fotoperiódus) meghatározza a virágzási időt, ezáltal időzítve azt az év legmegfelelőbb időszakára. Az *Arabidopsis* fakultatív hosszú nappalos növény, így a nappalok hosszabbodása indukálja a virágzását, ám fakultatív jellege miatt, hosszabb idő elteltével azért rövid nappalon is virágzik. A cirkadián óra és a fényjelátvitel elemeinek együttműködése szabályozza a *CONSTANS* (CO) aktivitását, mely fehérje a fotoperiodikus virágzás kulcs eleme a levélben. A CO tagja egy BBX (B-Box Zinc-Finger) transzkripciós faktor családnak. Az N terminális részén egy B1 és B2 fehérje interakciós elem, a C terminális részén pedig egy ún. CCT (CO, CO-like, TOC1) DNS-kötő elem található (Johansson és Staiger 2014). A CO aktiválja a *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) és a sokkal alacsonyabb szinten kifejeződő *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*) expresszióját a levélben (Samach és mtsai 2000, Yamaguchi és mtsai 2005). Az *FT* (mint florigén) a levélből a floémen keresztül az apikális merisztémába vándorol (Corbesier és mtsai 2007, Mathieu és mtsai 2007). Az *FT* fehérje a merisztémában komplexet formál az *FD* és *FD PARALOGUE* bZIP (basic leucin zipper) transzkripciós faktorokkal és aktiválja a virágzási szignálokat integráló *SUPPRESSOR OF CONSTANS*

OVEREXPRESSION1 (SOC1) gént és, közvetlenül illetve SOC1-en keresztül közvetve, az *APETALA1 (AP1)* és *LEAFY (LFY)* virág merisztéma azonossági géneket. Majd az *AP1* és a *LFY* kiváltják a virág szerveinek identitását meghatározó homeotikus gének kifejeződését, ami a reprodukív módosult hajtás, a virág, kifejlődéséhez vezet.

3.3.1.1.A CO transzkripció szabályozása

Nem induktív, azaz virágzást nem indukáló rövid nappalos körülmények között a *CO* mRNS cirkadián oszcillációt mutat, és ZT 8 és ZT 10 között van maximuma, ám a *CO* fehérje lebomlik sötétben, így nincs felhalmozódás. A CYCLING DOF FACTOR (CDF) fehérje gátolja a *CO* transzkripciót reggel, azáltal, hogy a *CO* promóterben található CTTT elemhez képes kötődni. A CTTT elem része a *CO* promóterben megtalálható 7 bázispáros CTTTACA ismétlődésnek, mely ismétlődések száma összefügg a virágzási idővel (Imaizumi és mtsai 2005, Fornara és mtsai 2009).

A CDF1 és CDF2 szabályozásában a fényfüggő módon kialakuló GI és FKF1 komplexnek jelentős szerepe van. Rövid nappalon a GI (ZT 7) és az FKF1 (ZT10) az éjszaka folyamán mutat expressziós maximumot, nincs köztük kölcsönhatás, így a CDF fehérje aktív marad. Hosszú nappalon, a GI és FKF1 szinkronba kerül, a kifejeződési maximumuk ZT13 körül van. Kék fény hatására komplexet képeznek, amely stabilizálja az FKF1 fehérjét, majd a komplex proteaszóma degradációra jelöli ki a CDF1 és CDF2 fehérjéket. Ezáltal a gátlás alól felszabaduló *CO* ZT12-16 körül mutat expressziós maximumot, így a fényben felhalmozódó és stabilizálódó *CO* fehérje aktiválja az *FT* transzkripcióját és virágzást indukál (Sawa és mtsai 2007).

Az utóbbi években újabb elemek szerepére derült fény a *CO* expressziójával kapcsolatban. Az ELF4 éjszaka korlátozza *CO* promóter hozzáférhetőségét a GI számára, azáltal, hogy a GI fehérjét elkülöníti (Kim és mtsai 2013). A DAY NEUTRAL FLOWERING (DNF) csökkenti a *CO* szintet ZT4 és ZT6 között, rövid nappalos körülmények között. Egy membrán kötött E3 ligázt kódol, amelynek célfehérjei még ismeretlenek (Morris és mtsai 2013). A *CO* transzkripció aktivátoraként működnek a FLOWERING BHLH (basic helix loop helix) FBH1-4 fehérjék. Az FBH1 képes a *CO* promóteréhez kötődni végig a nap folyamán (Ito és mtsai 2012).

A PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME (PFT1), a transzkripció faktorokat az RNS polimeráz II-vel összekapcsoló mediátor komplex MED25 alegysége, indukálja a *CO* kifejeződését, valamint az *FT CO* független expresszióját (Inigo és mtsai 2011).

3.3.1.2. A CO fehérje szintjének szabályozása

Rövid nappalos körülmények között a COP1 és a SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A-105 1 (SPA1) komplex lebontásra jelöli ki a CO fehérjét az éjszaka folyamán, megakadályozva ezzel a felhalmozódását. A nappal során pedig az aktivált phyB jelöli meg degradációra a CO fehérjét egy eddig még ismeretlen ubikvitin ligáz segítségével. Ugyanebben az időszakban egy másik E3 ubikvitin ligáz, a HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1 (HOS1) kapcsolódik a CO fehérjéhez, és destabilizálja azt (Jang és mtsai 2008, Valverde és mtsai 2004, Lazaro és mtsai 2012).

Hosszú nappalon, a fényaktivált kriptokrómok csökkentik a COP1–SPA1 komplex aktivitását. A CRY1 képes kötődni a SPA1 C terminális részéhez, megakadályozva ezzel, hogy a SPA1 a COP1 fehérjéhez kötődjön, ami a COP1 funkció gátlását okozza. A CRY2 a SPA1 N terminális részéhez kapcsolódik, erősíti a SPA1-COP1 kölcsönhatást, ám gátolja a létrejött komplex működését (Lian és mtsai 2011, Liu és mtsai 2011, Zuo és mtsai 2011).

A kriptokrómokon kívül a phyA is hozzájárul a CO fehérje stabilizálásához (Valverde és mtsai 2004).

A nappal második felében az FKF1 kapcsolódik a CO fehérjéhez és stabilizálja azt kék fény hatására (Song és mtsai 2012).

A PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE FLOWERING (PHL) képes rövidíteni a virágzási időt azáltal, hogy vörös fény-függő módon kölcsönhat a phyB és CO fehérjével, ezáltal ellensúlyozva a phyB gátló hatását (Endo és mtsai 2013).

A CO transzkripció és poszttranszláció szabályozásának egyes lépései példaként szolgálhatnak a belső és külső koincidencia modell elméletekre is. Az egyik a GI és FKF1 belső ritmusának az összehangolása, a másik az FKF1 aktivitásának szabályozása kék fény-függő módon, valamint a COP1/SPA1 aktivitás szabályozása a kriptokrómokon keresztül a CO oszcillációjának maximumán, mely lehetővé teszi a CO fehérje felhalmozódását.

3.3.1.3. Az FT transzkripció szabályozása

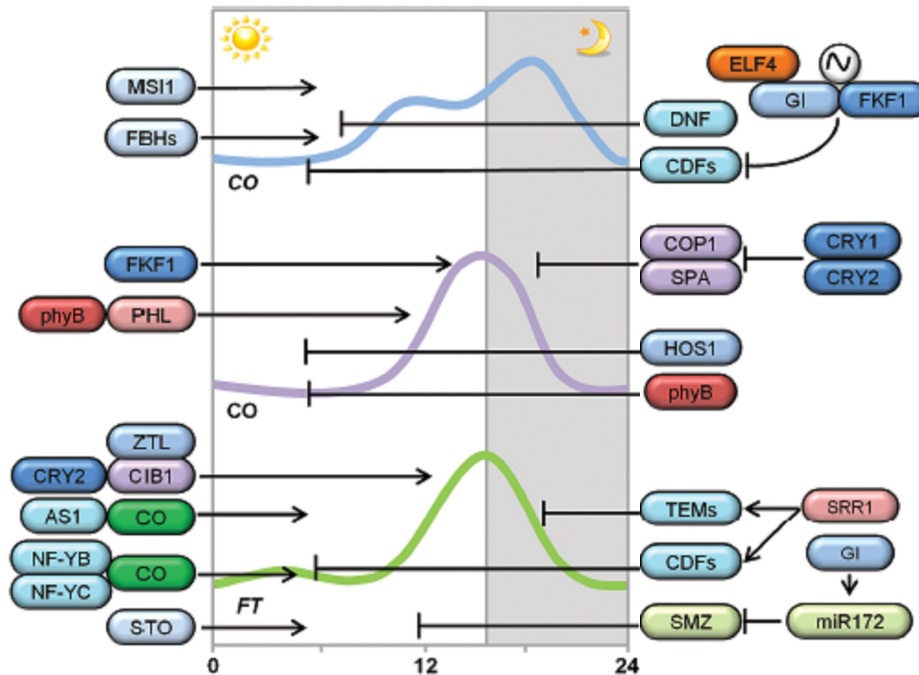
Számos fehérje jól szervezett rendszerben szabályozza az FT transzkripcióját. A CO fehérje egyik legfontosabb feladata az FT expressziójának az indukciója, hasonló logikát követ a kifejeződésük időzítése is. A CO képes kötődni az FT promóter régiójában található kétún. „CO-responsive elements” (CORES) részhez, és indukálni

az *FT* gén átírását (Tiwari és mtsai 2010). A NUCLEAR FACTOR Y (NF-Y) komplex képes fokozni az *FT* CO általi aktivációját, azáltal, hogy a CO kölcsönhatásba lép a NF-YB és NF-YC alegységekkel (Kumimoto és mtsai 2008, Wenkel és mtsai 2006). A CDF fehérjék nemcsak a *CO* expresszió fontos represszorai, hanem az *FT* promóteréhez is képesek kapcsolódni és gátolni annak transzkripcióját a reggel során. A GI és az FKF1 szintén képesek közvetlenül az *FT* promóteréhez kapcsolódni, ahonnan az FKF1 eltávolítja a CDF1 fehérjét, ezáltal indukálja az *FT* expresszióját (Song és mtsai 2012, Sawa és Kay 2011). Ezen kívül a CRYPTOCHROME-INTERACTING BASIC-HELIX-LOOP-HELIX1 (CIB1) a CRY2 fehérjével kölcsönhatva aktiválódik és így pozitívan indukálja az *FT* expressziót (Liu és mtsai 2008). A TEMPRANILLO (TEM1) és TEM2 transzkripciós represszorok versengenek a CO fehérjével, hogy az *FT* promóteréhez kötődjenek. A TEM1 és TEM2 kölcsönhat a GI fehérjével, amely szerepet játszik az *FT* represszorok stabilitásának szabályozásában. A *TEM1* és *TEM2* expresszióját indukálja a SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED1 (SRR1) fehérje, amelyet a vörös fény jelátvitelben és a cirkadián óra szabályozásában betöltött szerepe alapján azonosítottak. Az SRR1 gátolja a virágzást nem induktív körülmények között, azáltal hogy az *FT* represszorok expresszióját közvetlenül indukálja. Ilyen represszor a *CDF1* és a virágzás legfontosabb negatív szabályozója a *FLOWERING LOCUS C (FLC)* is. Az SRR1 befolyásolja a virágzást mind fotoperiódusfüggő és független módon (Sawa és Kay 2011, Castillejo és Pelaz 2008, Johansson és Staiger 2014, Staiger és mtsai 2003). Ezen kívül az ASSYMMETRIC LEAVES 1 (AS1) is képes az *FT* promóterhez kapcsolódni és kölcsönhatni a CO fehérjével, hogy aktiválja az *FT* expresszióját (Song és mtsai 2012). A SALT TOLERANT (STO) a cirkadián óra szabályozása alatt áll, és aktiválja az *FT* expresszióját, azáltal, hogy verseng az *FLC*-vel (Li és mtsai 2014).

3.3.1.4. Az *FT* fehérje funkciója

Számos kutatás bemutatta már, hogy az *FT* fehérje az a mobil jel, a florigén, amely tulajdonképpen a virágzás fotoperiodikus szabályozási útjának a kimeneti eleme. Az *FT* egy kicsi globuláris fehérje, mely a háncsrész mentén a levélből a hajtás apikális merisztémába vándorol induktív körülmények között. A merisztémában az *FT* komplexet formál az FD „bZIP – basic leucin zipper” transzkripciós faktorról. Majd a komplex közvetve/közvetlenül aktiválja a virágzási szignál integrátor illetve virágmerisztéma azonossági géneket, mint a SUPPRESSOR OF CONSTANS 1

(SOC1), az APETALA 1 (AP1), és a LEAFY (LFY) (Corbesier és mtsai 2007, Abe és mtsai 2005).



5. ábra. A CO és FT fotoperiodikus szabályozása hosszú nappalon

Legfelül a COmRNS, középen a CO fehérje ritmikus felhalmozódása, alul pedig az FT kifejeződési mintázata látható. A gátló elemek a jobb, a pozitív szabályozók pedig a baloldalon találhatók. Az idő ZT (zeitgeber) idő. A CO kifejeződését pozitívan szabályozza a MSI1 és az FBH1-4, a CDF és DNF fehérjék pedig gátolják a transzkripcióját. A CO fehérje felhalmozódását segítik az FKF1 és PHL fehérjék, a SPA1-COP1 komplex, phyB és a HOS1 pedig gátolják. Az FT transzkripcióját aktiválják a CO, NF-YB, NF-YC, AS1, CIB1 és a STO faktorok, míg a TEM1 és TEM2, a CDF és az SMZ faktorok represszálják. A nyílak végének a pozíciója utal arra, hogy mikor fejtik ki hatásukat a különböző elemek. A nyíl aktivációt, a tompa végű formája pedig repressziót jelez. (Johansson és Staiger 2014)

3.3.2. Vernalizációs útvonala

A fény és a fotoperiódus mellett a hőmérséklet is fontos tényező a virágzás szabályozásában. A vernalizáció a génexpresszió epigenetikai megváltozásával jár. Ezek olyan változások, amelyek a DNS szekvenciát nem, de a transzkripció aktivitást érintik, mely aztán öröklődhet az utódsejtekbe. A változás stabil, a hideghatás után is megmarad. A FRIGIDA (FRI) és a FLOWERING LOCUS C (FLC) fehérjéknek van a legjelentősebb szerepe a vernalizáció során. A FRI pozitívan szabályozza az FLC expresszióját, mely a virágzás egyik jelentős represszora. Az FLC egy MADS box

fehérjét kódol, mely közvetlenül gátolja virágzás gének expresszióját, mint a *SOC1* és az *FT*. Az *FLC* transzkripcióját a tartós hidegkezelés hatására bekövetkező hiszton-metiláció, mint epigenetikus módosítás, hatékonyan gátolja. Egy másik fontos gátló fehérje a SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP), mely szintén gátolja a *SOC1* és *FT* expresszióját *FLC*-függő módon (Michaels és Amasino 1999, Geraldo és mtsai 2009, Hartmann és mtsai 2000, Lee és mtsai 2007).

3.3.3. Gibberellin útvonal

Ez az útvonal olyan hormonális szabályozási láncokat takar, amelyek általában a *SOC1* és a *LFY* kifejeződését befolyásolják.

A gibberellin útvonal stressz-indukált, illetve nem induktív rövid nappalos körülmények között történő virágzás esetén játszik fontos szerepet. Meg kell említeni a GAMYB - MYB transzkripciós faktorok - szerepét, amelyek gibberellinsav hatására aktiválódnak, és pozitívan szabályozzák a *LFY* expressziót. A DELLA fehérjék gátolják a GAMYB faktorok ezen funkcióját. A gibberellin számos útvonalon keresztül serkenti a *SOC1* expresszióját azáltal, hogy elősegíti a *SOC1*-et indukáló gének kifejeződését, ugyanakkor represszál olyan virágzást gátló faktorokat, mint az SVP.

A növényi stressz hormon - az etilén- késlelteti a virágzást a *LFY* és a *SOC1* gátlása által DELLA-függő módon (Li és mtsai 2008, Blázquez és Weigel 2000, Achard és mtsai 2004).

3.3.4. Autonóm útvonal

Minden az ebben az útvonalban szerepet játszó gén a merisztémában fejeződik ki, és az *FLC* gátlásán keresztül közvetetten fejt ki hatását a virágzás szabályozására. Ilyenkor a növény belső fejlődési tényezőkre válaszol, ilyen például egy adott levélszám elérése (Simpson 2004).

4. Célkitűzések

Már régóta ismert tény, hogy a phyB fotoreceptor túltermelése (hasonlóan a phyB hiánymutánsához) korai virágzást eredményez, különösen rövid nappalos körülmények között (Bagnall és mtsai 1995). Ez teljesen ellentétben áll a phyB fotoreceptor jól meghatározott, a virágzás szabályozásában betöltött szerepével.

A munkánk elsődleges és legfontosabb célja az volt, hogy megpróbáljuk megtalálni a magyarázatot erre a paradox helyzetre, azáltal, hogy felderítjük a molekuláris mechanizmust mely a phyB fotoreceptort túltermelő növények korai virágzását okozza.

Ennek érdekében az alábbi főbb vizsgálati pontokat terveztük:

1. Vajon a cirkadián óra és az óra által szabályzott gének expressziójának a fázis változása okozza-e a phyB túltermelő növények korai virágzását?
2. Milyen jelátviteli láncon keresztül érvényesül a phyB túltermelés korai virágzást indukáló hatása? Milyen módon és mértékben érintett a CO/FT útvonal ebben a folyamatban?
3. Milyen szerepet játszik a phyB Ser-86 foszforilációja a cirkadián óra beállításában és a virágzás fotoperiodikus indukciójában?

5. Anyagok és módszerek

5.1. Kísérleti anyagok és élőlények

5.1.1. Tápoldatok, táptalajok, antibiotikumok

Bakteriális táptalajok

LB (Luria-Bertani Medium) (pH=7.0): 1% (w/v) tripton (Reanal), 0.5% (w/v) élesztő kivonat (Reanal), 1% (w/v) NaCl (Reanal); táptalajhoz: 1.5% (w/v) agar (Reanal)

YEB (pH=7.0): 0.5% (w/v) beef extract (Difco), 0.1% (w/v) élesztő kivonat, 0.5% (w/v) Bacto[®]-pepton (Difco), 0.5% (w/v) szaharóz (Reanal), 2mM MgSO₄ (csírámentesre szűrve, autoklávozás után hozzáadva; Sigma); táptalajhoz: 1.5% (w/v) Bacto[®]-agar (Difco)

Élesztő táptalajok

YPAD (pH=7.0) 1% (w/v) élesztő kivonat, 2% (w/v) Bacto[®]-pepton, 2% (w/v) glükóz, 0.01% (w/v) adenin hemiszulfát (Sigma); táptalajhoz: 1.5% Bacto[®]-agar

CSM (Complete Supplement Mixture) (pH=7.0): 2% (w/v) glükóz, 0.67% (w/v) yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco), 0.64 g/l Leu⁻/Trp⁻ CSM (Qbiogene) vagy 0.63g/l Ade⁻/Leu⁻/Trp⁻ CSM (Qbiogene); táptalajhoz: 1.5% (w/v) Bacto[®]-agar

Növényi táptalajok

MS3 (Murashige-Skoog Medium)(pH=5.6): 4.3 g/l MS por (Sigma), 3% (w/v) szaharóz, 1% (w/v) agar (Difco)

AM (Arabidopsis Medium) (pH=5.6): 2.16 g/l MS por, 1% (w/v) szaharóz, 0.2% (w/v) phytigel (Sigma)

Munkánk során az alábbi antibiotikumokat használtuk, melyeket csíramentesre szűrve az autoklávozott (121°C, 25 perc) és 60°C-ra hűtött tápoldatba, ill. táptalajba kevertünk.

Faj	Antibiotikum	Végkoncentráció
<i>Escherichia coli</i>	Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
	Tetraciklin (Tet)	100 µg/ml
	Kloramfenikol (Cm)	170 µg/ml
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Karbenicillin (Cb)	100 µg/ml
	Kanamycin (Km)	50 µg/ml
	Rifampicin (Rif)	25 µg/ml
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Higromicin (Hyg)	15 µg/ml
	Klaforán (Cf)*	200 µg/ml
	BASTA®**	20 000×

1. Táblázat. Az alkalmazott antibiotikumok listája

* A klaforánt nem válogatásra használtuk AM és MS táptalajokban, hanem azért, hogy csökkentsük a baktériumok általi fertőzés esélyét.

** A BASTA® nem antibiotikum, hanem gyomirtó. Az AgrEvo (Bad Soden, Németország) cég által forgalmazott oldatot csíramentesre szűrve a fenti hígításban használtuk AM táptalajban.

5.1.2. Plazmidok leírása

Baktérium plazmidok

A génépítéshez általában pBluescript® II KS/SK plazmidot (Stratagene) használtunk, vagy egyből a célplazmidban raktuk össze a géndarabokat.

Élesztő kéthibrid plazmidok

Az élesztő kéthibrid kísérletekben a vizsgálandó fehérjék kódoló részeit pGADT7 és pGBKT7 (Clontech) kétgazdás plazmidokba klónoztuk. A pGADT7 segítségével a baktériumból származó GAL4 transzkripciós fehérje átírást serkentő eleméhez (AD) fuzionált fehérjéket tudunk magas szinten kifejeztetni élesztőben. A pGBKT7 alkalmazásával viszont a GAL4 DNS-kötő eleméhez (BD) építhetjük a fehérjéket. Az

élesztősejten belül a GAL4 két eleme működőképes transzkripciós fehérjévé képes összeállni, ha a két darabhoz fúzionált fehérjék kölcsönhatnak (Chien és mtsai 1991). A pGADT7 a plazmidon kódolt *LEU2* gén segítségével a leucin tápanyagfüggőséget, míg a pGBKT7 *TRP1* génje révén a triptofán-függőséget hidalja át. A két plazmid együttes jelenlétét a sejtekben ezért leucin- és triptofánhiányos (L⁻W⁻) táptalajon tudjuk biztosítani.

Növényi plazmidok

A lúdfű genetikai átalakítására használt pPCV (Plant Cloning Vector) plazmidot Dr. Koncz Csaba csoportja fejlesztette ki. Ennek BASTA[®]-ellenállóságot biztosító változatát (pPCVB) Dr. Szekeres Miklós készítette el. Ezek a plazmidok az *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plazmidján alapulnak. A jobb és bal oldali határelemek közötti DNS szakaszt (T-DNS) az *Agrobacterium* képes átjuttatni növényi sejtekbe, ahol azok véletlenszerűen beépülnek a növény génállományába. A pPCV plazmidok T-DNS-ének egyik része olyan elemeket tartalmaz, amelyek lehetővé teszik a plazmid szaporodását *Escherichia coli* sejtekben (ORI_{ColEI} másolási kezdőpont és az ampicillin/karbenicillin ellenállóságot okozó β-laktamáz gén), míg a másik részében plazmidot hordozó növények válogatását lehetővé tevő, a higromicin ellenállóságért felelős neomicin-foszfotranszferáz gént (pPCVH), vagy a BASTA[®] ellenállóságért felelős foszfinotricin-acetiltranszferáz gént (pPCVB) helyezték el. A plazmid T-DNS részébe beépítettek egy, a génépítést megkönnyítő, egyedi restrikciós endonukleáz hasítóhelyeket hordozó szakaszt is.

5.1.3 Baktériumok

A molekuláris klónozás során az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzset használtuk (Stratagene). A növénybe juttatandó plazmidokat először *Escherichia coli* S17-1 törzsébe vittük be. Ez a törzs képes a plazmidot átadni az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM90RK) (Rif^R) törzsének, amely azután a növénybe viszi be a határelemek közötti idegen DNS-t (T-DNS).

5.1.4 Élesztő

Az élesztő kéthibrid vizsgálatokhoz a *Saccharomyces cerevisiae* Y190 törzset használtuk.

5.1.5. Növények

Minden a kísérleteinkben használt vad típusú, mutáns ill. transzgenikus növény Columbia (Col) ökotípusú *Arabidopsis thaliana*.

A *phyB-9*, *co-9* és *ft-10* mutáns vonalak leírása megtalálható a következő cikkekben: Reed és mtsai 1994, Balasubramanian és mtsai 2006, Yoo és mtsai 2005.

A Medzihradszky és munkatársai által 2013-ban megjelentetett publikációban található a vad típusú [WT], a Ser86Ala [S86A] és a Ser86Asp [S86D] mutáns *phyB*-t GFP vagy YFP fluoreszcens fúziós fehérjeként túltermelő transzgenikus vonalak leírása.

A *CCAI:LUC* és *GI:LUC* riporter géneket Col és *phyB-9* háttérben kifejező vonalakat egy korábbi munkánk során állítottuk elő (Palágyi és mtsai 2010). A *phyB-9* háttérű növényekből keresztezéssel juttattuk át a *CCAI:LUC* és *GI:LUC* transzgéneket a túltermelő vonalainkba.

A QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) leírásának megfelelően állítottuk elő a Tyr276His (Y276H) és Cys357Thr (C357T) aminosav cseréket a teljes hosszúságú *PHYB* cDNS-en. A mutáns cDNS-t a pPCVB bináris vektorba klónoztuk *XbaI-SmaI* hasítóhelyekre, a karfiol mozaik vírus 35S promótere és a *YFP* gén közé. Majd a konstrukciókat *phyB-9* növényekbe transzformáltuk. A homozigóta T3 vonalak közül kiválasztottuk azokat, amelyek mind expressziós szintben mind a fotomorfogenikus tulajdonságaikban összehasonlíthatóak a *phyB* túltermelő vonalainkkal.

5.2. Molekuláris biológiai módszerek

5.2.1 Riportergén konstrukciók készítése

A restriktációs endonukleáz emésztéseket és egyéb DNS módosító kezeléseket a gyártó (Fermentas) által szállított pufferekben és körülmények között végeztük, majd a termékeket agaróz gélen (SeaKem® LE, Cambrex), elektroforézissel választottuk el, a megfelelő DNS darabokat a gélből kivágva fenolozással tisztítottuk. A darabok összevarrását a T4 DNS ligáz gyártójának (Fermentas) útmutatásai alapján végeztük. Az összevarrt DNS-eket Inoue módszere (Inoue és mtsai 1990) szerint előkészített XL-1 Blue sejtekbe egy gyors és hatékony módszerrel (Pope és Kent 1996) juttattuk be. A plazmidot hordozó baktériumsejtek kiválogatását a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezekon 37 °C-on 16 órán át végeztük. A plazmidokat *Escherichia coli* sejtekből

a hagyományos lúgos feltárás módosított változatával tisztítottuk (Ahn és mtsai 2000), amelyeket azután restrikciós enzimekkel ellenőriztünk.

5.2.2. *Agrobacterium* konjugáció

Az elkészült bináris plazmid vektort *E. coli* S17-1 törzsbe transzformáltuk, majd 2 ml-es, ampicillinnel kiegészített LB folyadékkultúrában 16 órán át növesztettük. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzséből YEB tápoldatban, 24 óra alatt szintén friss folyadékkultúrát neveltünk. A két baktérium szuszpenzióból 1-1 ml-t összekevertünk és YEB táplemezen együtt növesztettük. 24 óra után a növekedésnek indult baktériumtenyészetből kis mennyiséget rifampicin, karbenicillin és kanamicin tartalmú YEB lemezre szélesztettünk, majd a felnövekvő rezisztens *Agrobacterium* – telepeket legalább 3 alkalommal passzáltuk. Az *E. coli*-tól megtisztított *Agrobacteriumot* használtuk *Arabidopsis* virág-infiltrációs transzformálásra.

5.2.3. Növényi DNS előállítása klónozáshoz, keresztezések sikerességének ellenőrzéséhez

Körülbelül 1 cm² területű levelet folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, majd 1.5 ml-es centrifugacsőben elporítottunk. A mintára 500µl 60°C-ra előmelegített 2×CTAB puffert (2% (w/v) CTAB, 100mM Tris·HCl pH=8.0, 20mM EDTA pH=8.0, 1.4 M NaCl, 1% (w/v) PVP 40, 0.5% β-merkaptóetanol) mértünk rá, majd többször összerázva a csövet, 30 percig 65°C-on tartottuk. 5 percnyi ülepités után a törmelékmentes felülúszót új csőbe szívtuk át és azonos térfogatú kloroformmal ráztuk össze. A vizes és a szerves fázist 5 perc centrifugálással választottuk szét. A felső vizes fázisból a nukleinsavakat 0.75 térfogatnyi 2-propanollal szobahőmérsékleten 10 perc alatt csaptuk ki, majd 10 perces centrifugálással ülepitettük. A csapadékot 70%-os etanollal mostuk, vákumszivattyúval megszáritottuk és 100µl csíramentes TE pufferben (10mM Tris·HCl pH=7.5, 1mM EDTA) feloldottuk. A mintát 10 µg RNáz-A enzimmel kezeltük 37°C-on 1 órán át, majd fenol-kloroform (1:1) elegyével ráztuk össze. Centrifugálás után a vizes fázist kloroformmal is tisztítottuk, majd a vizes fázisból a DNS-t 0.2 térfogatnyi 3 M nátrium-acetát pH=5.2 és 0.75 térfogatnyi 2-propanol hozzáadásával szobahőmérsékleten 10 perc alatt csaptuk ki. Centrifugálásos ülepités és 70%-os etanollal történő mosás után a csapadékot megszáritottuk és 100µl csíramentes TE-ben oldottuk fel. A mintából 1–2µl-t használtunk egy PCR-hez.

5.2.4. Sokmintás PCR

A PCR-eket 15 µl-es térfogatban végeztük, 96 helyes PCR lemezekben (ABgene). A lemezeket újrahasználható gumifedővel zártuk le (Applied Biosystems). A PCR reakció összetétele a *co-9* mutánsok ellenőrzéséhez: Green Dream Taq puffer (Thermo Scientific), 2U Dream Taq DNS polimeráz (Thermo Scientific), 0.25mM dNTP mix, 0.2 mM primerkeverék, desztillált víz. Az *ft-10* mutáns ellenőrzéséhez: Taq puffer with (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific), 2mM MgCl₂, 2U házi készítésű Taq DNS polimeráz, 0.25mM dNTP mix, 0.2 mM primerkeverék, desztillált víz. A *phyb-9* mutáció ellenőrzése 2 lépésben történt. Először egy PCR reakció, majd egy azt követő restrikciós enzimátikus hasítással különítettük el a vad típusú ill. mutáns formát. A PCR reakció összetétele: Dream Taq puffer (Thermo Scientific), 2U Dream Taq DNS polimeráz (Thermo Scientific), 0.25mM dNTP mix, 0.2 mM primerkeverék, desztillált víz. Az emésztés során a mintákat kiegészítettük 20 µl térfogatra: 2µl 10x TaqI puffer, 2µl szacharóz–krezolvörös keverék, és 3U TaqI restrikciós enzim és desztillált víz. Az emésztést egy éjszakán keresztül 65°C-on végeztük.

Mindhárom esetben 3µl DNS mintát adtunk a PCR reakcióelegyhez. Ezután 95 °C-ra felfűtött PCR gépbe helyeztük őket és elindítottuk a hőmérsékleti programot, amely általában a következő volt: 95 °C 2 perc, 40×(95 °C 1 perc, 55 °C 1 perc, 72 °C 2 perc), 72 °C 7 perc, 4 °C ∞. Kivétel a *phyb-9* esete, ahol 40×(95 °C 1 perc, 60 °C 1 perc, 72 °C 2 perc), 72 °C 7 perc, 4 °C ∞. Miután elkészültek - a *co-9* és *ft-10* esetén a PCR reakció után, a *phyb-9* esetén a restrikciós enzimátikus hasítás után - 0.5×TBE puffert és 3–4% agarózt (SeaKem™ LE, Cambrex) tartalmazó gélen választottuk el a PCR termékeket.

PCR primerek szekvenciája:

PhyB-9 dCAPS F GCA ATG TAG CTA GTG GAG ATG AGG CTT CG

PhyB-9 dCAPS R2 CAA CAA AAT AAT CAA ATA CCC GCG AAT TGG

ft-10 wt primerpár:

ft LP GGTGGAGAAGACCTCAGGAAC

ft RP TTTTGGGAGACAAATTGATGC

ft-10 mut primerpár:

ft RP TTTTGGGAGACAAATTGATGC

o8409 ATATTGACCATCATACTCATTGC

co-9 wt primerpár:

co LP AAGCTGTTGTGACACATGCTG

co RP CCCCTTCTTTCAGATACCAGC

co-9 mut primerpár:

co RP CCCCTTCTTTCAGATACCAGC

LB3S TTCATAACCAATCTCGATACAC

5.2.5. Növényi RNS izolálása

Össz-RNS-t ~100 mg, folyékony nitrogénben porított növényi anyagból a Qiagen RNeasy[®] Plant Mini Kit-jével tisztítottuk (oszlopon történő RNáz-mentes DNáz kezeléssel kiegészítve) a gyártó leírása alapján. A kapott RNS mennyiségét és minőségét a minta 260 és 280 nm-en mért fényelnyeléséből határoztuk meg.

A mintaszedés előtt a növényeket 10 napig neveltük a meghatározott körülmények között (rövid vagy hosszú nappal) MS3 táptalajon.

5.2.6. mRNS szint meghatározás valós idejű PCR segítségével

A kísérletekben meghatározott időpontokként leszedett teljes csíranövényeket tartalmazó mintákból össz-RNS-t izoláltunk. 1 µg RNS-ből cDNS-t készítettünk a Thermo Scientific által gyártott RevertAid[™] First-Strand cDNA Synthesis Kit felhasználásával, random hexamer primereket használva a gyártó útmutatásainak megfelelően. A termékeket RNáz-mentes vízzel ötszörösére hígítottuk. A *GI*, *CO* és a *FT* mRNS szintjét valós időben mért PCR-rel ABI PRISM[®] 7300 (Applied Biosystems) gépen, POWER SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) alkalmazásával 15 µl térfogatban határoztuk meg. Egy reakcióhoz 1.5 µl hígított cDNS templátot használtunk.

A mRNS szinteket az ún. „Standard Curve” módszerrel határoztuk meg. Ehhez a phyB[S86A] növények különböző időpontokban szedett, de egy teljes napot (rövid nappal) lefedő cDNS mintáiból egy keveréket képeztünk, amelyet 1-, 10-, 100-, 1000-szeresre hígítottunk. Ezekben a standard mintákban az egyes gén-specifikus primerek alkalmazásával meghatároztuk az adott amplifikációs küszöbértékhez tartozó ciklus-számokat. A kapott értékekre egyenest illesztettünk, amelynek meghatároztuk a segédváltozóit. Az ismeretlen mintákban az mRNS szinteket ennek a hitelesítő egyenesnek a segítségével számítottuk ki. A kapott értékeket a minták *TUB2/3* mRNS-

szintjére vonatkoztattuk. Minden mintát háromszor mértünk meg. A sokszorozáshoz használt primerek az alábbiak voltak, amelyeket 0.3 μ M töménységben alkalmaztunk:

GI RT-PCR F: 5'-AATTCAGCACGCGCCTATTG-3'
GI RT-PCR R: 5'-GTTGCTTCTGCTGCAGGAACTT-3'
CO RT-PCR F: 5'-ATATCAAATATGGCTCCTCAGG-3'
CO RT-PCR R: 5'-GGATGAAATGTATGCGTTATGG-3'
FT RT-PCR F: 5'-TATCTCCATTGGTTGGTGA CTG-3'
FT RT-PCR R: 5'-GGGACTTGGATTTTCGTAACAC-3'
TUB2/3 RT-1 F: 5'-CCAGCTTTGGTGATTTGAAC -3'
TUB2/3 RT-1 R: 5'-CAAGCTTTCGGAGGTCAGAG -3'

A PCR körülményei az alábbiak voltak: 94°C 2.5 perc, 40×(95°C 15 mp, 60°C 1 perc), 95°C 15 mp, 60°C 1 perc, 95°C 15 mp, 60°C 15 mp.

Minden kísérletünkben ugyanazt a standard cDNS sort használtuk, így a különböző ábrákon összevethetők egymással az expressziós szintek.

5.2.7. Növényi összfehérje tisztítása

50–100 mg növényi anyagot folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és 2 ml-es csőben porrá őröltük. Az elporított mintára 200 μ l/100 mg 95 C-ra előmelegített feltárási puffert mértünk (4 M urea, 5% (w/v) SDS, 5% (w/v) β -merkaptoetanol, 16.66% glicerol). A mintákat tovább őröltük addig, amíg nagyobb darabokat már nem láttunk az oldatban, majd 95°C-os termosztátba helyeztük őket 3 percre. Időnként erőteljesen összeráztuk a csöveket. A törmelék után centrifugálással ülepítettük 20 percig. A tiszta felülúszót új csövekbe mértük át. Az így elkészített minták azonnal felvihetők poliakrilamid gélre.

5.2.8. Fehérjeszint meghatározás Western blot módszerrel

Mintánként 20 μ g összfehérjét futtattunk meg 7%-os SDS-poliakrilamid gélen Tris/glicin/SDS futató pufferben. A kifutott gélből 2×15 percen keresztül transzfer pufferrel (12mM Tris-HCl pH=8.3, 96mM glicin, 20% (w/v) metanol) mostuk ki az SDS és urea maradványokat. A gélből az elválasztott fehérjéket elektroblot készülékkel (Bio-Rad; 80V,2h) átvittük Immobilon[®]-P PVDF (polivinilidén-difluorid) műanyag membrán (Millipore). Az átvitel után a lapot TBST pufferrel (20mM Tris-HCl pH=7.5, 150mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween[®] 20) öblítettük át. A szabadon maradt kötőhelyeket blokkoló pufferrel (5% (w/v) sovány tejpor, 1% (w/v) TBST pufferben) semlegesítettük 4°C-on egy éjszakán át. Ezután a membránt GFP elleni elsődleges ellenanyaggal

(Clontech, Living Colors A.v. Monoclonal Antibody JL–8, 2000-szeres hígításban) mostuk. Az ellenanyagot blokkoló pufferben 1,5 órán keresztül hagytuk a membránon, majd 3×5 perc TBST pufferben történő mosással távolítottuk el róla a felesleges ellenanyag maradványokat. Ezután blokkoló pufferben 5000-szeresre hígított, torna peroxidáz kapcsolt egér-IgG elleni másodlagos ellenanyagot (Thermo Scientific) adtunk hozzá, és így tartottuk szobahőmérsékleten 1 óráig. Ezt követően 3×15 percig TBST pufferben mostuk. A felesleges folyadék leitatása után a membránt rövid ideig Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Peroxidáz és Luminol reagensének 1:1 arányú oldatában áztattuk, majd CCD kamerával detektáltuk a kemilumineszcens jeleket.

5.3. Élesztőn alkalmazott eljárások

5.3.1. Fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata élesztő kéthibrid módszerrel

Az élesztő kéthibrid vizsgálatokhoz a *Saccharomyces cerevisiae* Y190 törzset használtuk. Az idegen DNS felvételére képes sejtek előállítását, a DNS bejuttatását, a kéthibrid szűrést, és egyéb élesztővel kapcsolatos műveleteket a *Methods in Molecular Biology* (John Walker, Humana Press, 2006) sorozat kéthibrid rendszerekről szóló kötetében leírtak szerint végeztük. Az élesztő sejtek tartalmazzák a Gal4 DNS kötő elemével (BD) fúzionált SPA1 fehérjét illetve a Gal4 transzkripciót aktiváló eleméhez épített phyB (WT vagy S86A vagy S86D) fúziós fehérjét. A sejteket felfuszpendáltuk 100 µl steril desztillált vízben (3-10 telepet típusonként). 10 µl szuszpenziót kicseppentettünk CSM-Leu-Trp élesztős táptalajra, ami még tartalmazott 20 µM PCB-t, ami cianobaktérium kromofór és szükséges in vitro körülmények között a fitokrómok megfelelő működéséhez. A lemezeket megszáritottuk és a sejteket 26°C-on, sötétben 2 napig növesztettük. Ezt követően 3 féle kezelést kaptak a lemezek: a, 30 óra sötétben b, 24 óra sötét 10 perc vörös kezelés, majd 6 óra sötét, c, 24 óra sötét majd 6 óra vörös kezelés (20 µmol/m²/s). Végül a sejteket sötétben (zöld lámpa alatt) leszedtük a lemezről 1 ml jéghideg Z-pufferbe, centrifugáltuk (5000 x g, 1 min), majd felfuszpendáltuk 200 µl Z-pufferben és lefagyasztottuk -80°C-on. Ezt követően ONPG elemzést végeztünk rajta (Sheerin és mtsai 2015).

5.3.2. β-galaktozidáz enzimműködés mérése

Az élesztők β -galaktozidáz aktivitás méréséhez Z-pufferben lefagyasztott mintákat használtuk és az ONPG (orto-nitrophenyl- β -galactoside) elemzést a Clontech élesztő kéthibrid kézikönyv alapján végeztük (Sheerin és mtsai 2015).

5.4. Növényeken alkalmazott eljárások

5.4.1. Növények előkészítése és nevelése

Felületkezeléshez a lúdfű magjait legalább 3 napig desztillált vízben 4 °C-on, sötétben duzzasztottuk, majd 10 percig 30%-os *Domestos* oldatban áztattuk. Ezután csíramentes desztillált vízzel ötször átmostuk. Az így felületkezelt magokat AM ill. MS3 lemezekre szélesztettük és általában 22°C-on, 12 óra fény/12 óra sötét körülmények között neveltük őket.

5.4.2. Transzformált növények létrehozása

Az *Agrobacterium* által hordozott idegen DNS növényekbe juttatására a virágmártogatásos módszert alkalmaztuk (Clough és Bent 1998). A felnevelt növényekről magot gyűjtöttünk, amelyekből a megfelelő gyomirtóval (BASTA), vagy klaforánnal és higromicinnel kiegészített MS3 vagy AM táptalajon csíramentes körülmények között kiválogattuk a rezisztens egyedeket (T1 nemzedék). Ezeket a megfelelő erősségű gyökérzet kialakulása után (10–12 nap) földbe ültettük és az üvegházban felneveltük. Általában 20–30 független T1 vonalat állítottunk elő. Vizsgálatainkat a T3 nemzedék idegen génre nézve homozigóta egyedein végeztük.

5.4.3. Fénykezelések

A fénykezelésekhez a Quantum Devices Inc (USA) Snaplite™ LED-eket tartalmazó egyszínű fényforrásait használtuk. Az alkalmazott vörös fény hullámhossza 665 ± 15 nm, a távoli-vörös fény hullámhossza 730 ± 15 nm, a kék fény hullámhossza 470 ± 15 nm, az erősségük kísérletenként meghatározott.

5.4.4. Lumineszcencia mérés élő növényben

A luciferázos riporter géneket kifejező csíranövényeket 12 óra fehér fény ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)/12 óra sötét váltakozó fényviszonyok mellett állandó 22°C-on 6 napig neveltük MS3 lemezekre. A mérés kezdete előtt 6 órával a csíranövényeket csíramentes körülmények között 96 zsebes lemezbe emeltük át, melynek minden zsebe

0.25 ml MS3 táptalajt tartalmazott. Minden növényre 20 µl 2.5mM-os luciferin oldatot cseppentettünk. A mérés a csírázást követő hetedik napon indult. A méréseket TopCount® NXT™ önműködő luminométerrel (Perkin Elmer) végeztük 2-7 napig, amely a lemez zsebeiben elhelyezett csíranövény által kibocsátott fényt 1–2 óránként a mérési idő végéig rögzítette. A mérési eredmények feldolgozása a TopTemp nevű Microsoft Excel makróval (Dr. Andrew Millar ajándéka) történt. A mért értékeket az összes mért érték átlagával osztottuk el. Ezt az adatot az idő függvényében ábráztuk. Az időtengely 0 pontja az utolsó sötét/fehér fény átmenet időpontja (ZT0).

5.4.5. A cirkadián óra beállíthatóságának vizsgálata

Folyamatos fénnel történő beállítás (Fluence rate curve – FRC)

FRC készítéséhez a *CCAI:LUC+* riportergént hordozó növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény (50 µmol/m²/s) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos fénybe helyeztük őket és 5 napig 2 óránként mértük a lumineszcenciájukat. A mérés idejére a lemezeket a TopCount® NXT™ önműködő luminométerbe (Perkin Elmer) helyeztük, majd a mérés után visszatettük őket a folyamatos fénybe. A növények periódusának statisztikai elemzését a Biological Rhythms Analysis Software System (BRASS) program Fast Fourier Transform-Non-Linear-Last Squares (FFT-NLS) módszerrel végeztük. A periódus középértékének becslése során csak azokat az értékeket vettük figyelembe, amelyek 15 és 40 óra közé estek (cirkadián tartomány).

Fénypulzussal történő beállítás

A *CCAI:LUC+* riportergént hordozó növényeket 12 óra sötét/12 óra fehér fény (50 µmol/m²/s) váltásokkal állítottuk be 7 napig, majd folyamatos sötétbe helyeztük őket és 5 napig folyamatosan mértük a lumineszcenciájukat. Majd 33 óra sötét periódus után 1 óra, 1 vagy 75 µmol/m²/s fénypulzust kapott a növények fele. A különböző periódusú növények fázisainak összehasonlíthatósága érdekében a fáziscsúszásokat a következő módon számítottuk ki: a kezelt növények új fázisát (a folyamatos sötétbe helyezés után jelentkező harmadik cirkadián csúcs idejét) a kezeletlen, folyamatosan sötétben mérődő növények fázisából kivontuk. A negatív értékek jelzik ezért az óra késését, minthogy a csúcs később jelenik meg, mint a kezeletlen növényekben. A pozitív értékek a hamarabb érkező, siető csúcsot jelölik. Megmértük továbbá az adott növényvonal folyamatos sötétben mérhető periódusát is. Ezt az értéket elosztottuk 24-gyel, majd a kapott arányszámmal szoroztuk be az összes fáziskülönbséget, valamint a pulzusok

időpontjait is. Így minden értéket egy névleges 24 órás napon belül tudtunk feltüntetni (cirkadián idő).

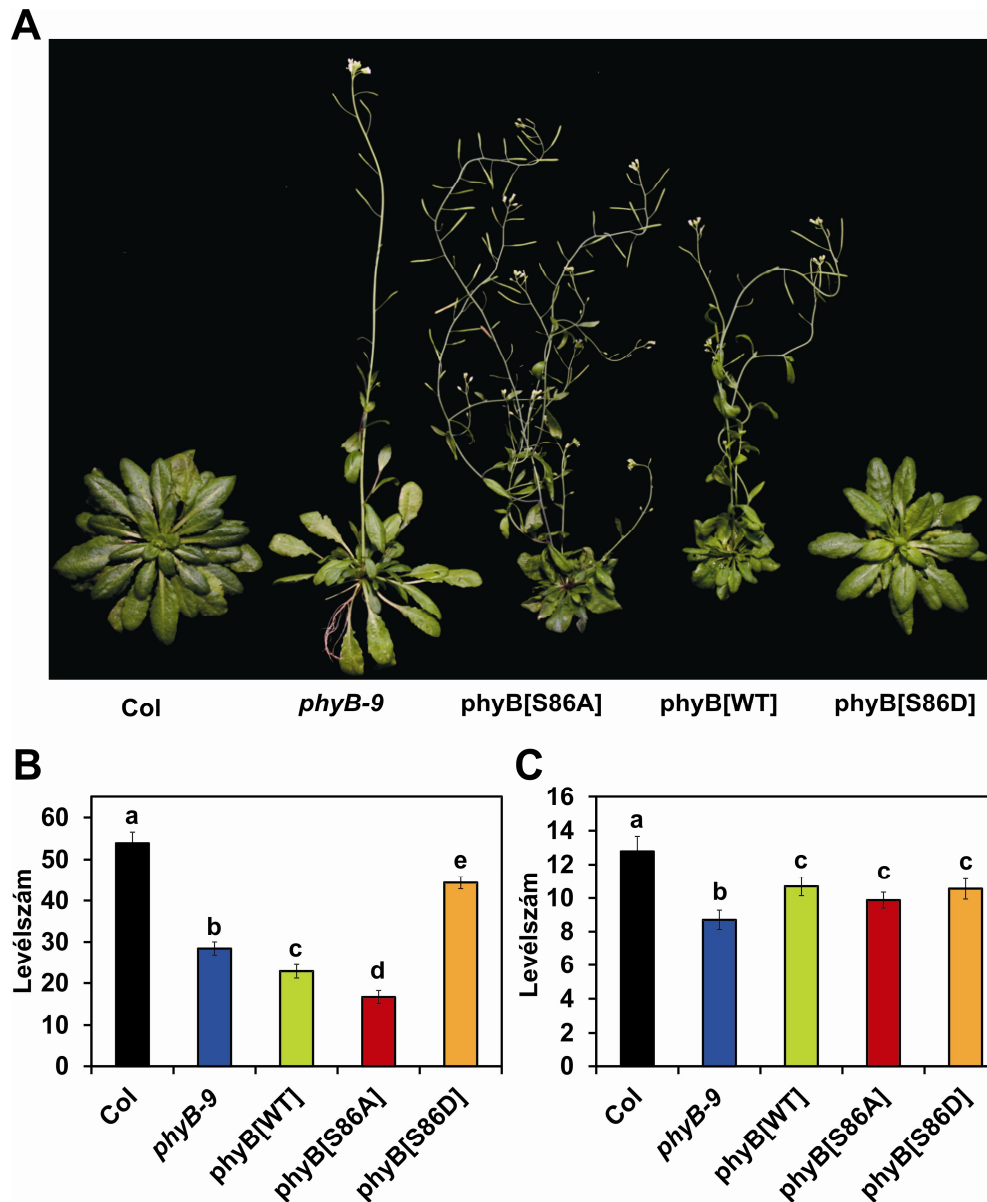
5.4.6. A virágzási idő meghatározása

A magokat nedves talajra vetettük, majd 3 napig sötétben, 4°C-on tartottuk. Ezután állandó hőmérsékletet (22°C) biztosító növény-nevelőkamrákba helyeztük őket rövid- (8 óra fehér fény 16 óra sötét) illetve hosszú- (16 óra fehér fény, 8 óra sötét) nappalos körülményeket előállítva. A fényforrás fehér fluoreszcens fénycső volt, mely 70-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ erősségű fehér fényt bocsát ki. A virágzási idő meghatározásához akkor számoltuk meg a tölevélrőzsát, amikor a virágzati tengely hossza elérte az 1 cm-t. Minden mérésben legalább 30 növény szerepelt.

6. Eredmények

6.1. A phyB túltermelő növények korai virágzás fenotípusa nem a megváltozott cirkadián ritmusnak köszönhető

Célunk volt, hogy megvizsgáljuk a phyB túltermelésének hatását a virágzás indukciójára, valamint a phyB Ser-86 aminosav foszforilációjának hatását erre a folyamatra. Ez utóbbi módosítás jelentős hatással van a phyB Pfr formájának a sötét reverziójára, vagyis arra a folyamatra, amelynek során az aktív Pfr forma spontán módon alakul vissza az inaktív Pr formává. A Ser-86 aminosav a cseréje Ala (nem foszforilálódó – phyB[S86A]) vagy Asp (folyamatos foszforiláltságot imitáló – phyB[S86D]) aminosavra lassítja vagy gyorsítja sötét reverziót, így nem telítési fényviszonyok mellett növeli vagy csökkenti a phyB Pfr formák mennyiségét. Telítési fényviszonyok mellett viszont a fent említett foszfo-mutációknak nincs érdemi hatása a Pfr szintre, így a vörös fény indukált jelátvitelre sem. Mivel feltételeztük, hogy a phyB Pfr formája szükséges a virágzás indukciójához, kísérleteinkbe bevontuk a phyB foszfo-mutáns formáit túltermelő vonalakat (Medzihradszky és mtsai 2013). Kontrollként egy vad típusú phyB-t túltermelő vonalat (phyB[WT]) alkalmaztunk. A vad típusú phyB-t túltermelő vonal GFP fúziós fehérjét, a két Ser-86 mutáns phyB-t túltermelő vonal pedig YFP fúziós fehérjét expresszált erős konstitutív promóterrel (*35S*) vezérelve a *phyB-9* null mutáns háttérben. A növényeket rövid (8 óra fény/ 16 óra sötét) és hosszú (16 óra fény/ 8 óra sötét) nappalon neveltük és a virágzási időt a tölevélrózsát alkotó levelek megszámlálásával határoztuk meg akkor, amikor a virágzati tengely már 1 cm. Mind *phyB-9* és a phyB[WT] korábban virágzott, mint a Columbia (Col) növények (6.ábra). Rövid nappalon kifejezettebb volt a jelenség, de mindkét vonal megőrizte fotoperiodikus érzékenységét a virágzás tekintetében. A phyB túltermelő vonalak azonos virágzási időt mutattak hosszú nappalon, azonban rövid nappalon a phyB[S86A] korábban, a phyB[S86D] pedig később virágzott, mint a phyB[WT]. A fehérje szintek vizsgálata megmutatta, hogy ezek a különbségek nem az eltérő expressziós szinteknek köszönhetőek, ezek a vonalak ugyanis azonos szinten fejezik ki a phyB fotoreceptor fehérjét (7. ábra). A CO fehérje stabilizációja a nap során még magyarázatul szolgálhat a *phyB-9* korai virágzására (Valverde és mtsai 2004), de a phyB túltermelésének virágzás fenotípusára továbbra sem sikerült magyarázatot találni.



6. ábra. Col, *phyB-9*, *phyB[S86A]*, *phyB[WT]* és *phyB[S86D]* növények morfológiája és virágzási ideje

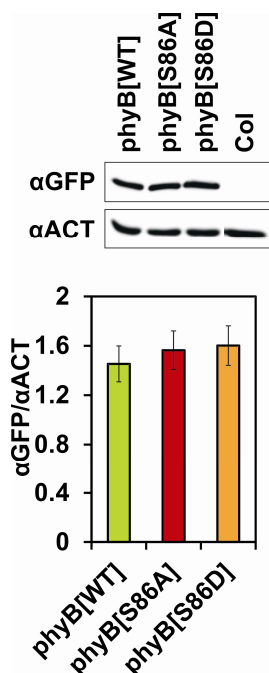
A: A növényeket 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között neveltük. A kép készítésekor a növények 45 naposak voltak.

B: Virágzási idő rövid nappalon

A növényeket 8 óra fény/16 óra sötét körülmények között neveltük. A tölevélrózsát alkotó leveleket megszámloltuk, amikor a virágzati tengely 1 cm-es volt. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).

C: Virágzási idő hosszú nappalon

A növényeket 16 óra fény/8 óra sötét körülmények között neveltük. A tölevélrózsát alkotó leveleket megszámloltuk, amikor a virágzati tengely 1 cm-es volt. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).

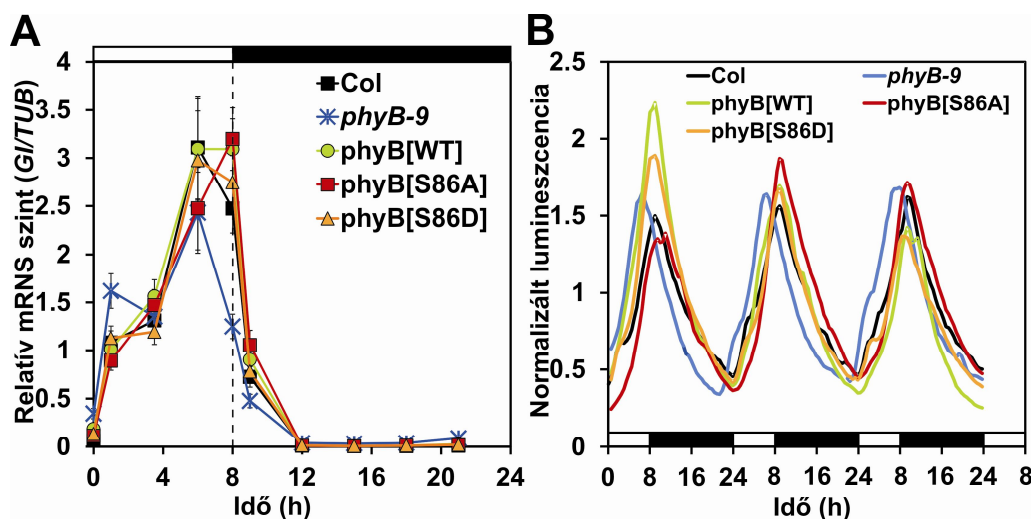


7.ábra. A phyB fúziós fehérjék mennyisége a különböző transzgenikus vonalakban

Western blot analízissel kimutattuk a PHYB-YFP és ACT szinteket rövid nappalon nevelt növényekben ZT16 időpontban. A növényeket 8 óra fény/16 óra sötét körülmények között neveltük 10 napig, majd ZT16 időpontban (az éjszaka közepén) mintát szedtünk. 10 µg összfehérje kivonatot futtattunk meg. AntiGFP (αGFP) és anti-ACTIN (αACT) ellenanyagot használtunk a próbához. Digitálisan határoztuk meg a jel erősségét, majd a GFP értékeket a megfelelő ACTIN értékekre normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják.

A phyB, mint fotoreceptor túltermelésétől azt várnánk, hogy a fény-bemenet felerősítése miatt rövidíti a cirkadián óra periódushosszát, ami az óra és az általa szabályozott ritmikus folyamatok (pl. *CO* kifejeződése) korai fázisát eredményezheti fény/sötét cikluson. A korai fázis így okozhatná a *CO* stabilizálódását és a korai virágzást, különösen rövid nappalon (Yanovsky és Kay 2002). Annak érdekében, hogy teszteljük ezt a felvetést, a *GI* kifejeződését vizsgáltuk rövid nappalos körülmények között. A *GI* a növényi cirkadián óra egyik komponense és a *CO* ritmikus expressziójának egyik igen fontos szabályzó eleme (Sawa és mtsai 2007, Locke és mtsai 2005, Fornara és mtsai 2009). A phyB túltermelése nem okozott változást a *GI* kifejeződésében rövid nappalos körülmények között, ám kissé korai fázist láthatunk a *phyB-9* növények esetén, ahogy ezt már közölték is néhány publikációban (Palagyi és mtsai 2010, Salome és mtsai 2002 (8.ábra A). Hogy pontosabban megfigyeljük a jelenséget, a *GI:LUC* riporter konstrukciót keresztezéssel bejuttattuk a vizsgált vonalakba. Ezekben a vonalakban, a lumineszcencia időbeli követésével a *GI* promóter aktivitására, vagyis a *GI* transzkripció óra általi szabályozására következtethetünk. A lumineszcenciát 3 napon keresztül, 30 perces időközönként rövid nappalon mértük (8. ábra B). A *phyB-9* növényekben korai fázist mutatott a *GI:LUC* expressziója, ám semmilyen változást nem detektáltunk a túltermelő vonalainkban.

Fenti eredményeink megerősítették, hogy a phyB túltermelése korai virágzást okoz, elsősorban rövid nappalon. Ezt a funkciót gátolja a Ser-86-os aminosav foszforilációja. A korai virágzás nem a cirkadián óra korai fázisának az eredménye, hanem arra utalhat, hogy a phyB túltermelése egyéb úton fejt ki hatását a fotoperiodikus virágzás szabályozás egy vagy több komponensére.



8. ábra. A *phyB* túltermelésének hatása a cirkadián ritmusok fázisára rövid nappalon

A: A *GI* mRNS mennyisége rövid nappalon

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A *GI* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-al (qPCR) állapítottuk meg. A *GI* értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.

B: A *GI:LUC* riporter konstrukció ritmusa rövid nappalon

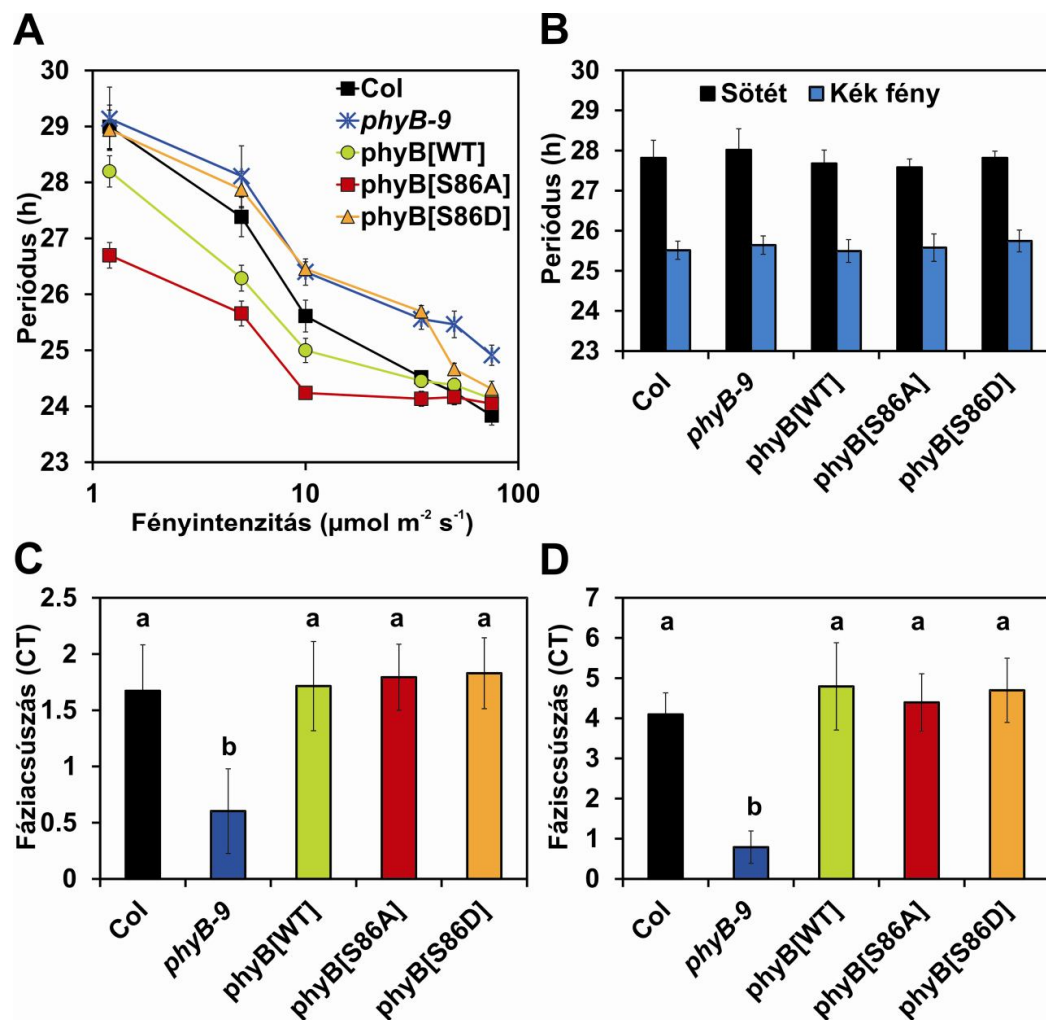
A *GI:LUC* konstrukciót kifejező növényeket 8 óra fény / 16 óra sötét körülmények között neveltük 10 napig, a lumineszcenciát a 8-10 napokon mértük. Minden egyes növény lumineszcenciáját normalizáltuk a mérés alatt rögzített összes beütésszám átlagára. A görbék 24 egyedi növény átlagát mutatják vonalanként.

6.2. A *phyB* foszforilációja módosítja az órához vezető vörös fény jelátvitelt

Miután megfigyeltük, hogy a cirkadián óra fázisa nem érintett a *phyB* túltermelő vonalakban fehér fény/sötét ciklusokon (8. ábra A-B.), specifikus, célzott kísérletekkel kívántuk megvizsgálni a vörös fény beállító hatását az óra felé ezekben a vonalakban. Növényekben a szabadon futó cirkadián ritmus periódusa rövidül a folyamatos fény intenzitásának növelésével (Aschoff-szabály, parametrikus beállítás). Hogy teszteljük ezt a választ, a *CCA1:LUC* riporter konstrukciót hordozó vonalainkat 7 napig 12 óra fény és 12 óra sötét ciklusokon neveltük, majd különböző intenzitású folyamatos vörös fénybe helyeztük őket, és mértük a lumineszcenciát 5 napon át (9. ábra A.). A Col növények a várt periódushossz rövidülést mutatták a fény intenzitás változásával, míg a *phyB-9* növények az alacsony intenzitás kivételével végig hosszabb periódust mutattak. A *phyB*[WT] növényeknek alacsony intenzitáson rövidebb a periódusuk, mint a Col növényeknek. A *phyB*[S86A] vonalak még a vad típusú túltermelő növényeknél is kifejezettebb (rövidebb) periódushossz fenotípust mutattak, valamint 10 és 75

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ vörös intenzitások között nem mutattak periódushossz változást. Ezzel ellentétben, a *phyB*[S86D] vonalak periódushossza alacsonyabb intenzitáson megegyezik a *phyB-9* esetén mért értékekkel, ám magasabb intenzitáson a periódushossza megegyezik a Col, a *phyB*[WT] és a *phyB*[S86A] növények periódushosszával. Folyamatos sötét, ill. folyamatos kék fény ($10\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) körülmények között nem találtunk különbséget a kontroll és a túltermelő vonalak között (9. ábra B.), amely teljesen összhangban van a korábbi eredményekkel, mely szerint nincs cirkadián fenotípusa a *phyB-9* mutánsnak ilyen körülmények között (Devlin és Kay 2000). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *phyB* Ser 86-os aminosav foszforilációja gátolja a receptor parametrikus beállításban betöltött funkcióját alacsony és közepes intenzitású ($1\text{--}35\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) folyamatos vörös fényben. Ezek után kíváncsiak voltunk vajon milyen választ kapunk, ha a pulzus-jellegű (vagy nem parametrikus) beállítást vizsgáljuk (Kevei és mtsai 2007). Ilyenkor a cirkadián oszcillátor szabadon fut folyamatos sötétben és a különböző időpontokban adott fénypulzusokra fáziscsúszásokkal válaszol. A fáziscsúszás iránya és nagysága függ a fénypulzus dózisától (ideje és intenzitása) és a cirkadián időtől, amikor a pulzus megtörténik. A kísérlethez a *CCA1:LUC* riportergént hordozó növényeket 7 napig neveltük 12 óra fény és 12 óra sötét ciklusokon, majd folyamatos sötétbe helyeztük őket és 5-6 napig mértük a lumineszcenciát. A sötétbe helyezést követő 33 óra után a növények egy csoportját 1 (9. ábra C.) ill 75 (9. ábra D.) $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ erősségű 1 h időtartamú vörös fény pulzussal kezeltük, majd visszatettük őket sötétbe és folytattuk a mérést. A fáziscsúszást a pulzust követő második csúcs indukált és nem indukált növényekben történő összehasonlításából számoltuk ki. A nem indukált növények periódushosszát megbecsültük és ezt használtuk fel arra, hogy a fáziscsúszások értékeit cirkadián időbe átszámoljuk. Ahogy vártuk is, minden vonal fázissietéssel válaszolt (ez a pozitív értékű fáziscsúszás). A *phyB-9* gyenge, de szignifikáns fáziscsúszással válaszolt, mely viszont független volt a fénypulzus dózisától. A Col és a *phyB* túltermelő növények hasonló sietéssel reagáltak a fénypulzusokra. Ezek a vonalak mindkét fényintenzitás esetén jelentősen nagyobb fáziscsúszással válaszoltak, mint a *phyB-9*, és a magas és alacsony intenzitású fénypulzussal kezelt növények tekintetében a sietés mértéke hozzávetőlegesen kétszeres különbséget mutatott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *phyB* dózisfüggő módon szerepet játszik az óra vörös fény általi beállításában, azonban már a receptor endogén szintje elégséges ahhoz, hogy a maximális választ megkapjuk. Az S86D mutáció hatásának hiánya jelzi, hogy a

túltermelés következtében még ebből a gyorsan revertáló phyB változatból is legalább annyi Pfr forma van jelen mindkét fénykörülmény mellett, mint az endogén vad típusú phyB receptorból.



9. ábra. A phyB foszforilációjának a szerepe az óra vörös fény bemenet szabályozásában

A: Vörös fényintenzitás válasz görbe

A *CCA1:LUC* riporter konstrukciót kifejező növényeket 12 óra fény/ 12 óra sötét körülmények között neveltük 7 napig, majd különböző erősségű folyamatos vörös fénybe helyeztük őket és mértük a lumineszcenciát. Majd meghatároztuk a szabadon futó ritmusok periódushosszát és ábráztuk a fényintenzitás függvényében. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják.

B: A *CCA1: LUC* riporter konstrukció kifejeződésének periódushossza folyamatos sötétben és folyamatos kék fényben.

A *CCA1:LUC* riporter konstrukciót kifejező növényeket 12 óra fény/ 12 óra sötét körülmények között neveltük 7 napig, majd folyamatos sötétbe illetve 10 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ erősségű folyamatos kék fénybe

helyeztük. Majd meghatároztuk a szabadon futó ritmusok periódushosszát és ábrázoltuk a fényintenzitás függvényében. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják.

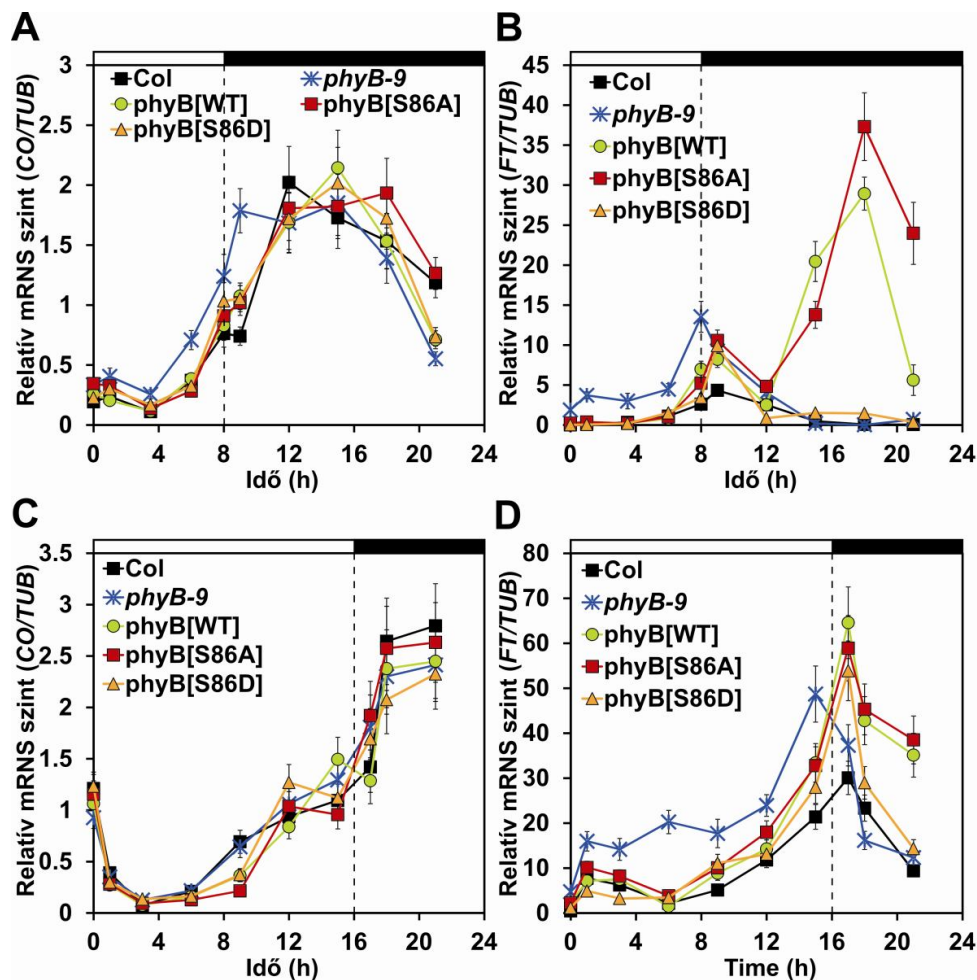
C-D: Vörös fény indukált fáziscsúszás

A *CCA1:LUC* riporter konstrukciót kifejező növényeket 12 óra fény/ 12 óra sötét körülmények között neveltük 7 napig, majd folyamatos sötétbe helyeztük őket. Majd 5 napig mértük a lumineszcenciát. ZT45 időpontban a növények felét 1 (C), a másik felét pedig $75 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (D) erősségű vörös fénnel kezeltük 1 órán át (ZT0 az utolsó sötét-fény átmenet időpontja). A fény indukált fáziscsúszást az indukált és a nem indukált növényekben a *CCA1:LUC* riporter konstrukció ritmusának az összehasonlításából számoltuk ki. A fáziseltolást cirkadián időben tüntettük fel (CT). A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).

6.3. A *phyB* túltermelő vonalak korai virágzás fenotípusa csak a CO és FT fehérjék jelenlétében nyilvánul meg

Abból a célból, hogy tisztázzuk a korai virágzás fenotípus molekuláris hátterét, meghatároztuk a *CO* és *FT* mRNS szinteket rövid (10. ábra A.-B.), ill. hosszú nappalon (10. ábra C.-D.) nőtt növényekben. A *CO* expressziós mintázata és szintje nem különbözött a vizsgált vonalakban, kivéve a *phyB-9* növényeket, ahol kifejezetten rövid nappalon a *CO* mRNS felhalmozódása korai fázist mutatott (10. ábra A.). A vad típusú Col növényekben az *FT* mRNS kifejeződési maximuma mindkét körülményen a fény-sötét átmenet idejére esett, ám rövid nappalon sokkal alacsonyabb szintű, mint hosszú nappalon (10. ábra B., D.). A *FT* expressziója a *phyB-9* növényekben a nappal során végig megemelkedett szintet mutatott, ám a fény lekapcsolását követően leesett a szintje a vad típusú növények szintjére. Ez a megfigyelés teljesen összhangban van a *phyB* CO degradációban betöltött pozitív szerepével a nappal során (Valverde és mtsai 2004). Rövid nappalon (10. ábra B.) a *phyB* túltermelő vonalakban az *FT* expressziója a Col növényekhez hasonló szinten van a nappal során. A fény-sötét átmenet idején kapott csúcs viszont magasabb a Col esetén kapott értékeknél. A fény lekapcsolása után a *phyB*[S86D] esetén az *FT* szintje leesik akár csak a Col ill. *phyB-9* növényekben. A *phyB*[WT] és [S86A] növények esetén az éjszaka során (ZT18) jelentősen megemelkedik az *FT* expressziója. Hosszú nappalon a *phyB* túltermelő vonalakban az *FT* kifejeződés szintje nagyon hasonló a nappal során, de alkonyatkor magasabb, mint a Col növényekben. A csúcsot követően a *phyB*[S86D] vonalakban visszaesik az *FT* szint a vad típusú növények szintjére, míg a *phyB*[WT] és [S86A] növényekben magasan marad az éjszaka során. Ezekből arra lehet következtetni, hogy a *phyB* túltermelése pozitívan szabályozza az *FT* transzkripciót fény-sötét átmenet idején és az

éjszaka során, valamint, hogy ez a funkció gyengül a Ser-86-os aminosav foszforilációjával.



10. ábra. A *phyB* túltermelése a *CO* transzkripció befolyásolása nélkül indukálja az *FT* kifejeződését este és éjszaka

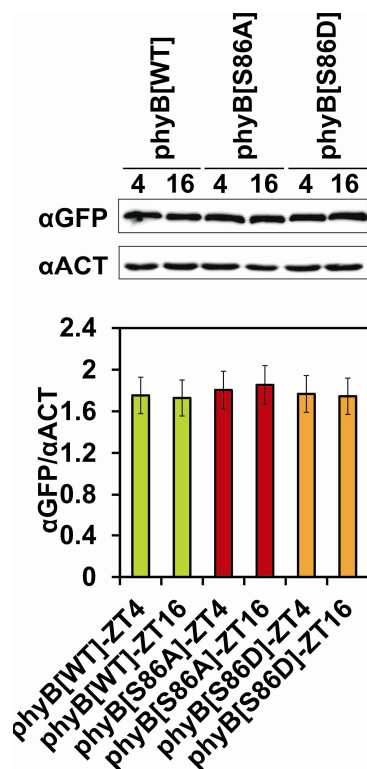
A-B: A *CO* és *FT* mRNS mennyisége rövid nappalon

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A *CO*, *FT* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-al (qPCR) állapítottuk meg. A *CO* (A) és *FT* (B) értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.

C-D: A *CO* és *FT* mRNS mennyisége hosszú nappalon

A növényeket 10 napig neveltük 16 óra fény/ 8 óra sötét körülmények között. A *CO*, *FT* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-al (qPCR) állapítottuk meg. A *CO* (C) és *FT* (D) értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.

Azt is megmutattuk, hogy ez a szabályozás nem a túltermelt *phyB* fehérjék mennyiségének napszakos változásának köszönhető (11. ábra).

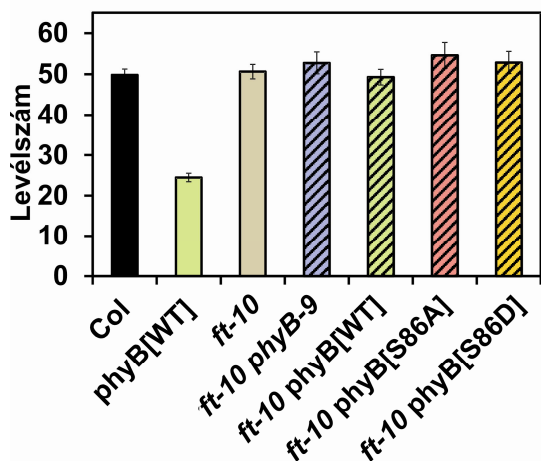


11. ábra. A phyB fúziós fehérje mennyisége a különböző transzgenikus vonalakban

Western blot analízissal kimutattuk a PHYB-YFP és ACT szinteket rövid nappalon nevelt növényekben ZT4 és ZT16 időpontokban. A növényeket 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között neveltük 10 napig, majd ZT4 (nappal közepén) és ZT16 (az éjszaka közepén) időpontokban mintát szedtünk. 10 µg összfehérje kivonatot futtattunk meg. Anti-GFP (αGFP) és anti-ACTIN (αACT) ellenanyagot használtunk a próbához. Digitálisan határoztuk meg a jel erősségét, majd a GFP értékeket a megfelelő ACTIN értékekre normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják.

Fontos megemlíteni, hogy ezek az eredmények azt is jelzik, hogy a phyB túltermelése nincs hatással az *FT* transzkripcióra a nappal során, ám megemeli az *FT* szintjét alkonyat környékén, mely jelenség független a Ser-86 foszforilációjától. A szoros összefüggés az *FT* szint és a virágzás között (6. ábra, 10. ábra B., D.) arra utal, hogy a korai virágzásért az *FT* megemelkedett mRNA mennyisége a felelős.

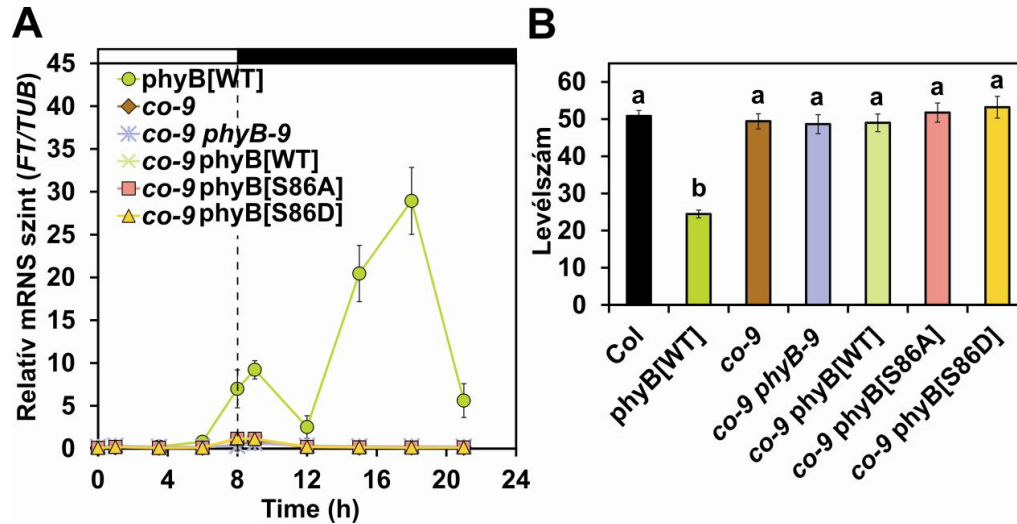
Hogy megerősítsük ezt felvetést, a phyB túltermelőket kereszteztük *ft-10* mutánsal (Yoo és mtsai 2005). Az *ft-10* mutációt egy intronba ágyazódott T-DNS inszerció okozza, ami a mérhető *FT* mRNA rendkívül alacsony szintjét eredményezi. Az *ft-10* mutáció teljesen eltüntette a túltermelő vonalak korai virágzás fenotípusát (12. ábra), ezzel alátámasztva azt, hogy a korai virágzásért a megemelkedett *FT* szint lehet a felelős.



12. ábra. A korai virágzás fenotípus függ az FT jelenlététől. Virágzási idő rövid nappalon.

A növényeket 8 óra fény/16 óra sötét körülmények között neveltük. A tölevélrózsát alkotó leveleket megszámoltuk, amikor a virágzati tengely 1 cm-es volt. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják.

A fotoperiodikus jelátvitel végső eleme a legfőképpen CO által szabályzott *FT* transzkripció (Samach és mtsai 2000). Azért, hogy teszteljük vajon a megemelkedett *FT* szinthez és a korai virágzás kialakulásához szükséges-e a CO fehérje, a *phyB* túltermelőket kereszteztük a T-DNS inszerciós *co-9* null mutánssal (Balasubramanian és mtsai 2006). A homozigóta utódokat rövid nappalon vizsgáltuk és azt találtuk, hogy minden vonalban igen alacsony *FT* szintet kaptunk végig a nap során, valamint teljesen eltűnt az éjszakai maximum a *phyB*[WT] és [S86A]vonalakban (13. ábra A.). A CO hiánya megszüntette a *phyB* túltermelő vonalak korai virágzás fenotípusát is (13. ábra B.). A *phyB* túltermelése nemcsak rövid, hanem hosszú nappalos körülmények mellett is korai virágzást okoz. Igazoltuk, hogy a fenotípus megnyilvánulásához hosszú nappalon is a CO/FT szabályozási út szükséges (14. ábra).



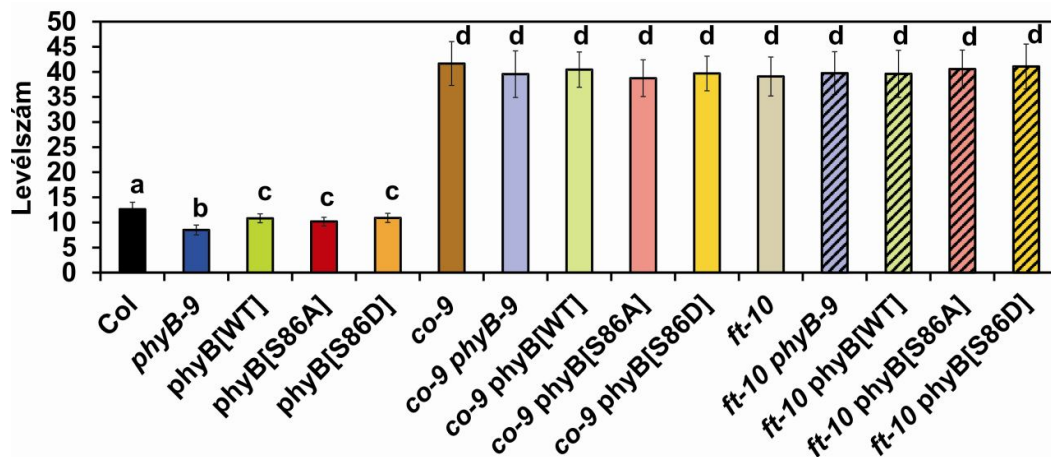
13. ábra. A CO hiányának hatása az *FT* mRNS mennyiségére és a virágzási időre.

A: Az *FT* mRNS mennyisége rövid nappalon

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A *FT* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-ral (qPCR) állapítottuk meg. A *FT* értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.

B: Virágzási idő rövid nappalon

A növényeket 8 óra fény/16 óra sötét körülmények között neveltük. A tölevélrózsát alkotó leveleket megszámoltuk, amikor a virágzati tengely 1 cm-es volt. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).



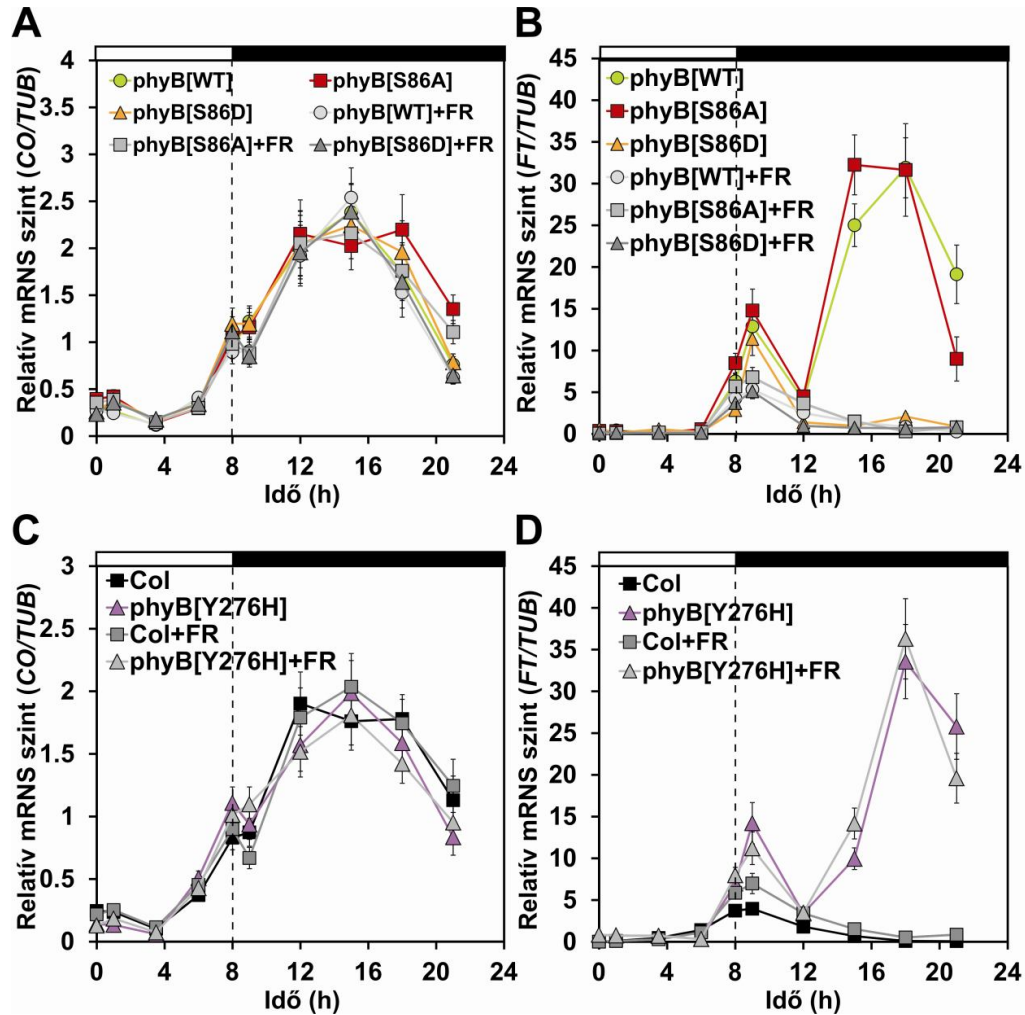
14. ábra. A CO és FT episztatikus a phyB fotoreceptorhoz képest hosszú nappalon is. Virágzási idő hosszú nappalon.

A növényeket 16 óra fény/8 óra sötét körülmények között neveltük. A tölevélrózsát alkotó leveleket megszámoltuk, amikor a virágzati tengely 1 cm-es volt. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).

6.4 Az éjszakai *FT* indukcióhoz szükség van a phyB Pfr formájára

A nappal során a phyB fotoreceptorok többsége a biológiailag aktív Pfr formában van. Miután sötétbe kerül a növény, a Pfr formájú receptorok mennyisége csökken, köszönhetően a proteozóma általi degradációnak, ill. a spontán reverziónak inaktív Pr formává. A Ser-86-os aminosav foszforilációja gyorsítja a sötét reverziót, így a foszforilációt utánzó phyB[S86D] forma esetén gyorsan, a nem foszforilálható phyB[S86A] forma esetén lassan csökken az aktív Pfr forma mennyisége (Medzihradszky és mtsai 2013). A phyB[S86A] és a phyB[S86D] mutánsok molekuláris és fiziológiai virágzás fenotípusában tapasztalt jelentős eltérés arra utalt, hogy az éjszakai *FT* expressziós csúcs a phyB[S86A] ill. phyB[WT] növényekben kapcsolatban lehet a tartósabban magas Pfr forma jelenlétével. Hogy teszteljük ezt a feltételezést, a növényeket rövid nappalon neveltük, majd mintát szedtünk, de a csíranövények felét 1 órán át távoli vörös fénnel kezeltük közvetlenül a fény lekapcsolása előtt, ezt hívjuk EODFR (End Of the Day Far-Red) pulzusnak. Ez a fénykezelés a phyA kivételével minden fitokrómot átalakít inaktív Pr formába. A távoli vörös pulzus nem volt hatással a *CO* mRNS szintre egyik vizsgált vonalban sem (15. ábra A.), viszont megszüntette az éjszakai *FT* csúcsot a phyB[S86A] és [WT] növényekben (15. ábra B.). A phyB Pfr formájának a szerepét megvizsgáltuk két további, szintén *phyB-9* háttérben kifejeztetett mutáns phyB segítségével is. A Tyr276His aminosav cserének (phyB[Y276H]) köszönhetően a fotoreceptor folyamatosan aktív Pfr formában van, függetlenül a fényviszonyoktól (Su és Lagarias 2007). Ezzel szemben a Cys357Thr aminosav csere megszünteti a kromofór kötőhelyét a fotoreceptoron, így egy állandóan inaktív Pr formájú fitokrómot kapunk (phyB[C357T]), szintén függetlenül a fényviszonyoktól (Clack és mtsai 2009).

A *CO* és *FT* mRNS szintek vizsgálatakor, illetve a virágzási idő meghatározásakor azt kaptuk, hogy a phyB[Y276H] - folyamatosan aktív forma - fenotípusa megegyezik a phyB[S86A] esetén mért eredménnyel, míg a phyB[C357T] vonalak megkülönböztethetetlenek voltak a *phyB-9* növényektől (16. ábra A.-C.). Mivel az *FT* transzkripció szintje nem változott a phyB[Y276H] növényekben EODFR kezelés hatására (15. ábra D.), ez megerősíti azt a megfigyelést, hogy az *FT* indukcióját alkonyatkor, ill. éjszaka kizárólag a phyB Pfr formája okozza a phyB túltermelő vonalakban. Ezek az eredmények újra alátámasztják, hogy a nagy mennyiségű phyB Pfr forma a szükséges és elégséges feltétele a phyB túltermelő vonalak molekuláris és fiziológiai korai virágzás fenotípusának.



15.ábra. A phyB Pfr formája szükséges az *FT* éjszakai indukciójához

A: Az End Of the Day Far-Red (EODFR) kezelés nincs hatással a *CO* mRNS mennyiségére

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A 10. napon a növények felét kezeltük 1 órás 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitású távoli vörös fényel (+FR), 1 órával a fény lekapcsolása előtt. A *CO* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-ral (qPCR) állapítottuk meg. A *CO* értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik

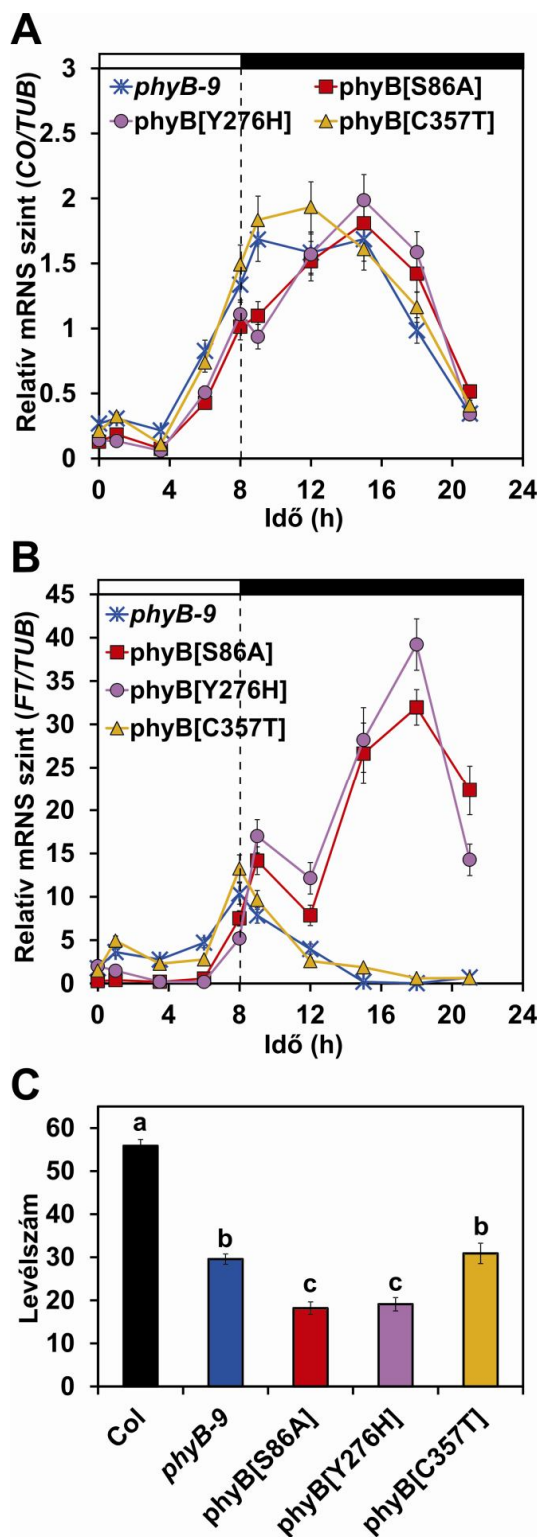
B: Az EODFR kezelés megszünteti az éjszakai *FT* indukciót

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A 10. napon a növények felét kezeltük 1 órás, 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitású távoli vörös fényel (+FR), 1 órával a fény lekapcsolása előtt. A *FT* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-ral (qPCR) állapítottuk meg. A *FT* értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.

C és D: A *CO* és *FT* mRNS mennyisége a konstitutívan Pfr formájú phyB[Y276H] mutáns receptort túltermelő vonalban

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A 10. napon a növények felét kezeltük 1 órás, 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitású távoli vörös fényel (+FR), 1 órával a fény lekapcsolása

előtt. A *FT*, *CO* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-ral (qPCR) állapítottuk meg. A *FT* és *CO* értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.



16. ábra. A phyB Pfr mennyiségét fény-független módon befolyásoló phyB mutációk molekuláris és fiziológiai virágzás fenotípusa

A és B: A *CO* és *FT* mRNS mennyisége rövid nappalon

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A *CO*, *FT* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-ral (qPCR) állapítottuk meg. A *CO* (C) és *FT* (D) értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.

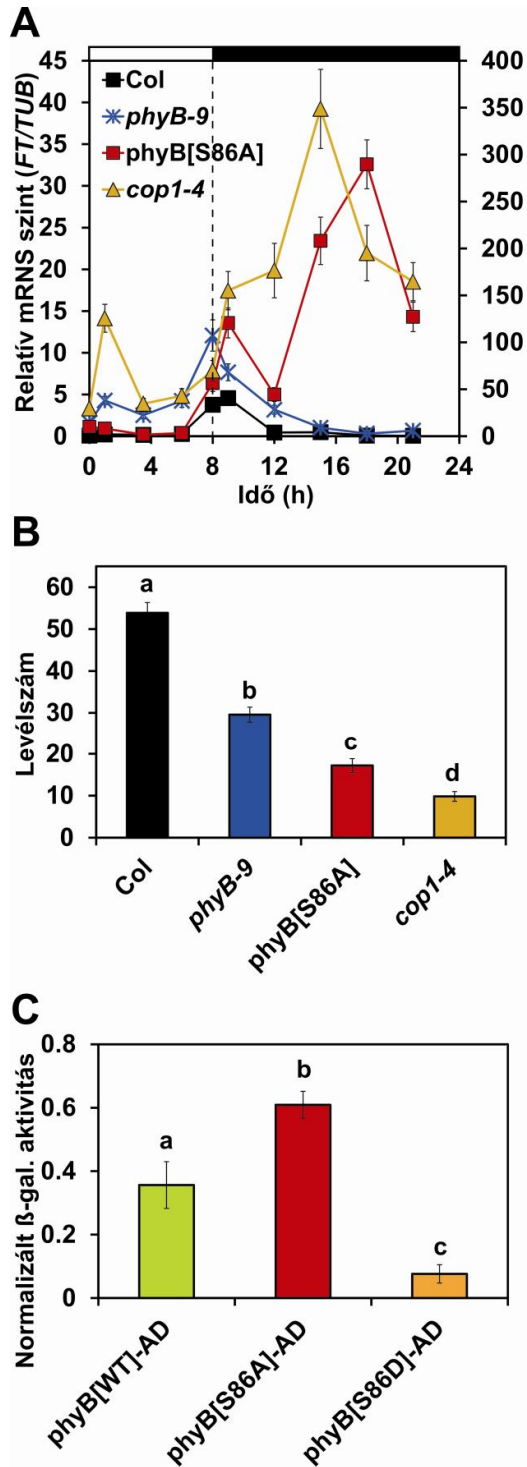
C: Virágzási idő rövid nappalon

A növényeket 8 óra fény/16 óra sötét körülmények között neveltük. A tölevélrózsát alkotó leveleket megszámláltuk, amikor a virágzati tengely 1 cm-es volt. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).

6.5 A phyB Pfr formája valószínűleg a COP1 aktivitásának gátlásán keresztül szabályozza a CO stabilitását és az *FT* transzkripcióját

Az eddigi kísérletek eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy a phyB túltermelő növények korai virágzásának a molekuláris alapja az lehet, hogy a phyB fotoreceptor Pfr formája stabilizálja a CO fehérjét alkonyat körül és az éjszaka során. A CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) egy E3 ubikvitin ligáz, amely ubikvitinálja a CO fehérjét, így elősegíti a degradációját ezekben az időpontokban (Jang és mtsai 2008). Mivel a COP1 aktivitását gátolják a fotoaktivált kriptokrómok és fitokrómok (Sheerin és mtsai 2015, Huang és mtsai 2014, Lu és mtsai 2015), így a COP1 gátlása a Pfr formájú phyB által magyarázhatná a megfigyelt virágzás fenotípust. Ha ez igaz, akkor hasonló molekuláris és fiziológiai fenotípust várunk a *cop1* mutánstól, mint amit a phyB[WT] és phyB[S86A] esetén kaptunk. Hogy teszteljük ezt az elméletet, meghatároztuk a virágzási időt és az *FT* mRNS szintet a *cop1-4* mutánsban (Mcnellis és mtsai 1994) is rövid nappalos körülmények között. Az *FT* mRNS mennyisége jelentősen, mintegy tízszer magasabb volt a *cop1-4* mutánsban, mint a phyB[S86A] növényekben végig a nap folyamán (17. ábra A.). Az *FT* mRNS felhalmozódásának a mintázata igen hasonló volt a phyB[S86A] esetén tapasztalt mintázattal. Alacsonyabb expressziót látunk a nappal során, majd alkonyatkor hirtelen megemelkedik a szintje, végül az éjszaka közepén eléri a maximális értéket. Ezzel a kifejezetten magas *FT* mRNS szinttel összhangban a *cop1-4* mutáns növényeknek extrém korán virágzó fenotípusuk van (17. ábra B). Ezek az adatok teljesen összhangban vannak a korábbi eredményekkel (Yu és mtsai 2008, Jang és mtsai 2008), és azzal a hipotézissel, amely szerint a phyB túltermelése korai virágzást okoz azért, hogy gyengíti a COP1 általi CO degradációt. A COP1 működése a SUPPRESSOR OF PHYA 105 1-4 (SPA1-4) fehérjékkel alkotott komplexben valósul meg, ahol a COP1 a katalitikus alegység, míg a SPA fehérjék (elsősorban a SPA1) funkciója a COP1 aktivitásának a serkentése fehérje-fehérje kölcsönhatás révén. A közelmúlt publikációi számolnak be arról, hogy a phyB Pfr formája kapcsolódik a SPA1 fehérjéhez, ezáltal gátolja a COP1-SPA1 kölcsönhatást, melynek eredménye a csökkent ubikvitin ligáz aktivitás és a COP1 célfehérjéinek - LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1 (HFR1) és ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) - felhalmozódása (Sheerin és mtsai 2015, Lu és mtsai 2015). Feltételeztük, hogy ha a phyB túltermelő vonalak virágzás fenotípusa ennek a mechanizmusnak köszönhető, akkor a phyB[WT], phyB[S86A] és

phyB[S86D] fehérjék különböző hatékonysággal kell kapcsolódjanak a SPA1 fehérjéhez az éjszaka korai szakaszában, amikor a Pfr forma mennyisége korlátozott. Hogy teszteljük ezt, a különböző phyB fehérjéket és a SPA1 proteint kifejeztettük és a kölcsönhatást elemeztük élesztő két hibrid rendszerben. Abból a célból, hogy utánozzuk a kora éjszaka körülményét, az élesztő sejteket sötétben növesztettük, 10 percig vörös fény pulzussal kezeltük őket, majd visszatettük a kultúrát sötét körülmények közé 6 óráig. Illetve ezzel párhuzamosan egy másik kultúrát folyamatos vörös fénybe helyeztünk 6 órára. A pulzussal kezelt minták β -galaktozidáz aktivitását a folyamatosan megvilágított mintákra normalizáltuk, azért hogy minimalizáljuk azokat a kötési képességből adódó különbségeket, amelyek függetlenek a sötét reverziótól. A három phyB fehérje közül a phyB[S86A] mutatta a legerősebb kötési aktivitást, ami tízszer magasabb volt a phyB[S86D] esetén mért értékeknél (17. ábra C.). A phyB variánsok SPA1 kötésének karakterisztikája jó összefüggést mutat azoknak a vonalaknak a molekuláris és fiziológiai fenotípusával, amelyek kifejezik ezeket a fehérjéket, alátámasztva ezzel azt a feltételezést, hogy a COP1 aktivitás phyB-SPA1 kölcsönhatás általi gátlása az elsődleges mechanizmusa a phyB túltermelő növények korai virágzásának.



17. ábra. A *cop1-4* mutáns molekuláris és fiziológiai fenotípusa hasonlít a *phyB[S86A]* fenotípusához

A: Az FT mRNS mennyisége rövid nappalon

A növényeket 10 napig neveltük 8 óra fény/ 16 óra sötét körülmények között. A *FT* és *TUB* mRNS szinteket valós idejű kvantitatív PCR-ral (qPCR) állapítottuk meg. A *FT* értékeket a megfelelő *TUB* adatokra normalizáltuk. A *cop1-4* mutánsban mért értékeket a másodlagos Y tengelyen ábráztuk. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A fehér és a sötét sávok a fény és a sötét időszakokat jelölik.

B: Virágzási idő rövid nappalon

A növényeket 8 óra fény/16 óra sötét körülmények között neveltük. A tölevélrózsát alkotó leveleket megszámoltuk, amikor a virágzati tengely 1 cm-es volt. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).

C: A phyB-SPA1 kölcsönhatás vizsgálata élesztőben

Az élesztő sejtekben kifejeztettük a SPA1-BD (Gal4 BD eleme) valamint a phyB[WT]-AD vagy phyB[S86A]-AD vagy phyB[S86D]-AD (Gal4 AD eleme) fúziós fehérjéket. A sejteket $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitású vörös fénnel kezeltük 10 percig, majd visszakerültek sötétbe 6 óra hosszára, vagy további 6 órányi folyamatos $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ erősségű vörös fénykezelést kaptak. A sejteket begyűjtöttük, majd β -galaktozidáz aktivitást mértünk bennük, amely a SPA1 és az egyes phyB változatok közt kialakult kölcsönhatás erősségével arányos. A 10 perces pulzussal kezelt minták értékeit normalizáltuk a folyamatos fénnel kezelt minták esetén kapott értékekre. A mérési hibahatárok a „standard error” (SE) mértékét mutatják. A különböző betűk szignifikáns különbségekre utalnak ($P < 0.01$, Duncan-féle teszt).

7. Eredmények értékelése

A nappal hosszúságának az érzékelése *Arabidopsis thaliana* növényben a ritmikus expressziót mutató CO fehérje fény szabályozott degradációján/stabilizálódásán alapul. A vörös /távoli vörös phyB fotoreceptor fokozza a CO lebomlását reggel és a nappal első felében egy eddig ismeretlen mechanizmus révén (Jang és mtsai 2008). A megemelkedett CO fehérje szint eredménye, hogy a *phyB* mutáns növények hamarabb virágoznak, mint a vad típusú növények (Valverde és mtsai 2004). Meglepő módon, a phyB túltermelő növények szintén korábban virágoznak (Bagnall és mtsai 1995), melynek eddig még nem volt ismert a molekuláris háttere. Eredményeink arra utalnak, hogy a phyB túltermelő vonalakban magas szinten felhalmozódó phyB Pfr forma, kölcsönhatásba lépve a SPA1 fehérjével gyengíti a SPA1-COP1 komplex funkcióját. A CO fehérje ennek hatására megnövekedett stabilizálódása magyarázhatja azt, hogy az FT transzkripció szintje alkonyatkor és az éjszaka közepén megemelkedik ezekben a vonalakban, ami korai virágzáshoz vezet.

7.1. A phyB túltermelése Pfr függő módon fokozza CO/FT útvonal aktivitását

A genetikai kapcsolatok elemzésével megmutattuk, hogy a phyB túltermelésének korai virágzás fenotípusa CO és FT függő (10., 12., 13. ábra). Azonkívül, hogy a phyB indukálja a CO fehérje degradációját, CO független módon is szabályozza a virágzást, feltételezhetően a PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1) közreműködésével (Cerdan és Chory 2003, Inigo és mtsai 2012). Mivel a phyB túltermelésének *co-9* mutáns háttérben nincs hatása a virágzási időre (13. ábra), így azt a következtetést vontuk le, hogy ez a hatás kizárólag CO függő útvonalon keresztül érvényesül. A CO/FT függő virágzás fenotípussal összhangban, megemelkedett FT mRNS szintet kaptunk a phyB túltermelő vonalakban rövid – és hosszú nappalon, alkonyatkor, ill. az éjszaka közepén (10. ábra). Mivel a CO mRNS szintben nem történik változás, így a túltermelt phyB a hatását a CO fehérje stabilizálásával érheti el ezekben az időpontokban. Ezzel ellentétben vad típusú növényben a phyB elősegíti a CO lebomlását vörös fény-függő módon, a nap első felében (Jang és mtsai 2008, Valverde és mtsai 2004).

Több irányból is megvizsgáltuk, hogy a phyB túltermelésének a hatása valóban Pfr formát igényel-e. Az egyik megközelítés az volt, hogy a nappal végén távoli vörös kezelést alkalmaztunk (EODFR), hogy eltüntessük a Pfr formákat még az éjszaka

kezdeté előtt. A kezelés hatására gyakorlatilag megszűnt az éjszakai *FT* mRNS felhalmozódás, valamint jelentős mértékben csökkent az alkonyatkor tapasztalt expressziós csúcs mérete is, igazolva ezzel, hogy az *FT* indukciója ezekben az időszakokban a phyB Pfr formájával hozható kapcsolatba (15.ábra A). Érdekességgéppen elmondható, hogy az EODFR kezelés gyorsítja a virágzást vad típusú, ill. néhány többszörös *phy* mutáns növényben. Ebből levonható az a következtetés, hogy az endogén phyB, phyD, és phyE Pfr formái még jelen vannak az éjszaka során és késleltetik a virágzást. (Bagnall és mtsai 1995, Devlin és mtsai 1998, Devlin és mtsai 1999). Ez a hatása az EODFR kezelésnek változatlan maradt a *co* mutánsban (Devlin és mtsai 1998), ám csökkent a *pft1* mutánsban (Cerdan és Chory 2003), utalva arra, hogy bár az EODFR kezelés a phyB, phyD és phyE fotoreceptorok funkcióját érinti, hatása egy CO-független és PFT1-függő útvonalon keresztül érvényesül (Inigo és mtsai 2012). Jóllehet az EODFR kezelés virágzást indukáló hatását a megemelkedett *FT* expresszióval magyarázták mások, a munkánk során alkalmazott besugárzás csak minimális mértékben emelte meg az *FT* mRNS szintet Col vad típusú növényben, amely valószínűleg nem okoz korai virágzást. Mindenképp érdemes megjegyezni, hogy a kísérleteinkben mi 10 napos növényeket kezeltünk egy alkalommal távoli vörös pulzussal, míg mások a virágzási idő megállapításához naponta alkalmazták az EODFR kezelést. Lehetséges, hogy az ismételt, hosszú távú alkalmazása az EODFR kezelésnek vagy az előrehaladottabb fejlődési stádium szükséges az *FT* transzkripció EODFR általi szabályozásához. Egyébként a *phyB phyD phyE ft* négyszeres mutánsnak az *ft* mutánshoz viszonyított korai virágzás fenotípusa arra utal, hogy nem az *FT* az egyetlen integrátor elem a phyB phyD és phyE alatt a jelátviteli rendszerben (Inigo és mtsai 2012). Mindazonáltal az EODFR kezelése inkább késleltetik, nem gyorsítják a virágzást a phyB túltermelő vonalakban (Bagnall és mtsai 1995), mely összhangban van az eredményeinkkel, melyek szerint az alkalmazott EODFR kezelés hatására a phyB túltermelő növényekben eltűnik az éjszakai *FT* transzkripció maximum.

Elemeztük a molekuláris és fiziológiai fenotípusát azoknak a túltermelő, mutáns phyB vonalaknak, ahol kondicionálisan vagy konstitutívan változott meg a Pfr forma mennyisége. A phyB Ser 86 aminosav foszforilációja gyorsítja a sötét reverziót, amely nem telítési fényviszonyok mellett gátolja a phyB-től induló jelátvitelt (Medzihradszky és mtsai 2013). Rövid nappalon, a phyB[S86A] növények kicsit magasabb *FT* indukciót mutattak éjszaka és korábban virágoztak, mint a phyB[WT] növények. Ezzel

ellentétben, a phyB[S86D] növények hasonló mértékű *FT* expressziót mutattak alkonyatkor, mint a phyB[WT] és a phyB[S86A] esetén, ám az éjszakai *FT* transzkripció maximum teljesen hiányzott (10. ábra). Ennek megfelelően, a phyB[S86D] növények jelentősen később virágoztak (44 levél), mint a phyB[WT] (23 levél) vagy a phyB[S86A] (17 levél), de korábban, mint a Col vad típusú növények (54 levél) (8. ábra.). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az *FT* expressziójának éjszakai indukciója fontos szerepet játszik a phyB túltermelő növények korai virágzás fenotípusának a kialakításában rövid nappalon. Hosszú nappalos körülmények között minden phyB túltermelő növény hasonló *FT* mRNS szintet mutat alkonyatkor, ami megközelítőleg kétszer magasabb volt, mint a Col esetén. Az *FT* mRNS szint magasan marad az éjszaka során phyB[WT] és phyB[S86A] esetén, ám hirtelen leesik a phyB[S86D] növények esetén. Mivel minden phyB túltermelő hasonló virágzási időt mutat, ami korábbi, mint a vad típusú Col növények virágzási ideje, úgy véltük, hogy az este megemelkedett *FT* expresszió a legmeghatározóbb a hosszú nappalon megfigyelt korai virágzás tekintetében (8., 10. ábra), és az éjszaka során tartósan magas *FT* mRNS nem járul hozzá jelentősen a fenotípushoz. Mivel rövid és hosszú nappalon is telítési fényintenzitással dolgoztunk, így a nappal végére minden phyB túltermelő vonalban megközelítően azonos mennyiségű Pfr formájú phyB volt jelen, amely megmutatkozott az alkonyatkor kapott hasonló *FT* indukcióban is. A sötét periódusban rövid és hosszú nappalon is, a Pfr mennyisége igen gyorsan csökken a phyB[S86D] vonalban, köszönhetően a gyorsabb sötét reverziónak. A phyB[WT] esetén lassabb, míg a phyB[S86A] esetén a leglassabb a Pfr forma mennyiségének a csökkenése (Medzihradszky és mtsai 2013). Ennek megfelelően az *FT* mRNS szintje éjszaka a phyB[S86D] vonalban alacsony, míg a phyB[WT] és phyB[S86A] növényekben magas szintet mutat. Mindent egybevetve az *FT* expressziós mintázata tökéletes összefüggést mutat a várt phyB Pfr mennyiségével a különböző vonalakban és a különböző körülmények között. A phyB[Y276H] növények olyan phyB fotoreceptort expresszálnak, mely folyamatosan Pfr formában van, míg a phyB[C357T] növények esetén pedig a phyB képtelen a kromofór kötésére, így folyamatosan Pr formában van. Mindkét esetben a fényviszonyoktól független konformációs állapotokról van szó. A phyB[Y276H] növények *FT* expressziós mintázata és virágzás fenotípusa azonos a phyB[S86A] esetén kapott eredményekkel, míg a phyB[C357T] a *phyB-9* mutánsához hasonló módon viselkedett, ezzel megerősítve, hogy a phyB túltermelő növények virágzás fenotípusához a phyB Pfr formája szükséges (16. ábra). Mindemellett azt is

megmutatják az eredmények, hogy a rövid nappalos éjszaka második felében megfigyelhető esés az *FT* mRNS szintben nem a csökkenő Pfr forma mennyiségének köszönhető, hiszen ez a jelenség megfigyelhető volt a folyamatosan Pfr formájú phyB[Y276H] vonalban is (16. ábra).

7.2. A phyB túltermelése stabilizálja a CO fehérjét azáltal, hogy gátolja a COP1-SPA1 komplex működését

Az adatainkból arra következtettünk, hogy a phyB Pfr forma nagy mennyisége stabilizálja a CO fehérjét alkonyatkor és az éjszaka folyamán. Ezekben az időszakokban a COP1-SPA1 ubikvitin ligáz komplex játszik jelentős szerepet a CO fehérje szabályozásában (Jang és mtsai 2008, Laubinger és mtsai 2006). A négy SPA fehérje (SPA1-4) jelentősen fokozza a COP1 fehérje ubikvitin ligáz aktivitását fizikai interakción keresztül (Huang és mtsai 2014). A virágzási idő szabályozásában a SPA1 és SPA4 szerepe az elsődleges (Ordóñez-Herrera és mtsai 2015). A *cop1* és *spa* mutánsok kifejezetten rövid nappalon korábban virágoznak, magasabb a CO fehérje szint és az *FT* mRNS szint alkonyatkor, valamint részben éjszaka is (Jang és mtsai 2008, Ordóñez-Herrera és mtsai 2015, Laubinger és mtsai 2006). Ezek az eredmények minőségileg nagyon hasonlóak azokhoz, amiket a phyB túltermelő vonalakban megfigyeltünk. Ebből arra következtettünk, hogy a phyB Pfr magas szintje azáltal gyorsítja a virágzást, hogy gátolja a COP1-SPA1 komplex működését. Számos fényaktivált fotoreceptorról megmutatták, hogy közvetlen interakció útján csökkenti ennek az ubikvitin ligáz komplexnek az aktivitását. Például, a CRY1 kölcsönhat a SPA1 fehérjével, gyengíti a SPA1 kötődését a COP1-hez, mely így gátolja a COP1 funkcióját (Lian és mtsai 2011). A CRY2 szintén kölcsönhat a SPA1 proteinnel, fokozza a SPA1 kötődését a COP1-hez, de gátolja a COP1 ubikvitin ligáz aktivitását a CO felé (Zuo és mtsai 2011). A közelmúltban mutatták meg, hogy a phyA és phyB Pfr formája kapcsolódni képes a SPA1 fehérjéhez, ezáltal gyengíti a SPA1-COP1 kölcsönhatást, melynek eredménye az alacsony COP1 aktivitás és a célfehérjék (HFR1 és HY5) felhalmozódása (Sheerin és mtsai 2015, Lu és mtsai 2015). Élesztő kéthibrid rendszer és limitált mennyiségű Pfr formát eredményező fényintenzitás alkalmazásával megmutattuk, hogy a vad típusú és a különböző foszfomutáns phyB receptorok SPA1-kötési hatékonysága szoros összhangban van az adott phyB formát túltermelő vonalakban az éjszaka során mért *FT* mRNS szintekkel (17. ábra). Ez alátámasztja, hogy a túltermelt phyB Pfr formája szabályozza a CO fehérje szintjét és a virágzási időt,

azáltal, hogy rontja a COP1–SPA1 interakciót. A CO fehérje nem az egyetlen virágzással kapcsolatos fehérje, amelyet a COP1 szabályoz, hiszen a *co cop1* dupla mutáns korábban virágzik, mint a *co* mutáns (Jang és mtsai 2008). Azt találtuk, hogy a phyB túltermelő növényekvirágzás fenotípusa – ellentétben a *cop1-4* mutáns esetével – teljes mértékig a CO fehérjétől függ, ami magyarázható azzal, hogy a phyB hatása a COP1 aktivitására gyengébb, mint a *cop1-4* mutáció hatása.

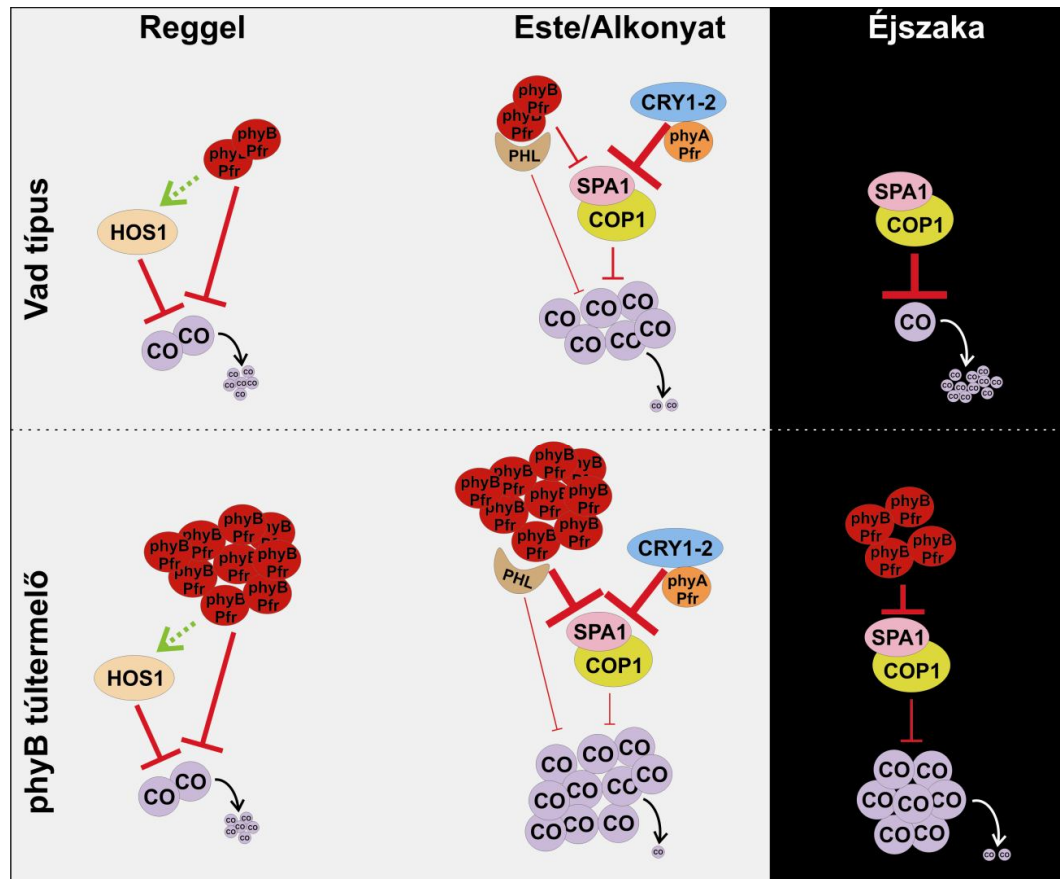
Ellentétben a phyB túltermelés hatásával, a phyB Pfr formája vad típusú növényben indukálja a CO degradációját a nappal során. Mivel a CO ubikvitinálódik és lebomlik a proteasómában (Valverde és mtsai 2004, Lazaro és mtsai 2012), így a phyB pozitívan kell szabályozzon egy ubikvitin ligázt, amely nem lehet azonos a COP1-SPA komplexszel. Korábbi eredményeink szerint a phyB N terminális régiójának a 450 és 651 aminosav közötti régiója szükséges ehhez a funkcióhoz (Palagyi és mtsai 2010). A HOS1 egy E3 ubikvitin ligáz, mely destabilizálja a CO fehérjét a nappal során, ugyanakkor, amikor a phyB is ezt teszi (Lazaro és mtsai 2012), így elképzelhető, hogy a HOS1 tölti be az ismeretlen ubikvitin ligáz szerepét. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy sem genetikai sem funkcionális kapcsolatot nem mutattak ki még a phyB és HOS1 között, sem a HOS1 fény szabályzott aktivitására nem derült még fény. Az ZTL, mint az SCF E3 ubikvitin ligáz komplex tagja, szabályozza a CO stabilitását reggel (Song és mtsai 2014). A ZTL kölcsönhat a phyB fotoreceptorral, ami közvetítheti a receptor hatását a CO stabilitására (Kevei és mtsai 2006, Jarillo és mtsai 2001), bár a ZTL szükségessége a phyB ezen hatásához még nem bizonyított. Mindazonáltal, ennek a szabályozásnak a hiánya azt eredményezte, hogy az *FT* szintje emelkedett volt végig a nap folyamán a *phyB-9* növényekben (10. ábra). Ezt a fenotípust teljesen komplementáltuk a phyB[WT], phyB[S86A] és phyB[S86D] túltermelő vonalakkal, rámutatva arra, hogy a viszonylag gyenge korai virágzás fenotípus a phyB[S86D] növények esetén, nem a *phyB-9* mutáns részleges komplementálása miatt látható, és hogy a phyB túltermelése a nap ezen időszakában nem indukál *FT* expressziót. (7., 10. ábra)

Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy a phyB fotoreceptor szerteágazó hatásának a CO stabilitás meghatározásában három fő aspektusa van: a napszak, a phyB Pfr mennyisége és a phyB Pfr által vezérelt ubikvitin ligáz általi szabályozás. A nap első felében a phyB indukálja a CO fehérje degradációját, függetlenül attól, hogy a phyB endogén (vad típusú), vagy túltermelt szinten van jelen. Ebben az időszakban a phyB valószínűleg fokozza a működését egy ismeretlen ubikvitin ligáznak, ami a CO

stabilitás szempontjából sokkal jelentősebb esemény, mint a COP1-SPA1 komplex gátlása a phyB által. A nap második felében és alkonyat körül az ismeretlen ubikvitin ligáz szerepe lesz elhanyagolható, ami legalább részben a PHL fehérjének köszönhető, ellensúlyozván a phyB hatását. Jóllehet a megemelkedett *FT* szint a *phyB-9* növényekben a nap második felében azt jelzi, hogy ez a hatás még nem teljesen hiányzik. A phyB túltermelése inkább indukálja, mint csökkenti az *FT* mRNS szintjét, indukálva ezzel a COP1-SPA1 komplex gátlásán keresztül érvényesülő fokozódó CO-stabilizáló hatás megjelenését. Éjszaka a COP1-SPA1 komplex hatása érvényesül leginkább a CO stabilitásán, így a phyB túltermelése erős *FT* indukciót eredményez, míg vad típusú növényekben az endogén phyB Pfr szintje valószínűleg nem elégséges ahhoz, hogy jelentős hatással legyen a COP1-SPA1 komplexre. A fenti következtetéseinket a 18. ábrán foglaltuk össze grafikus formában.

7.3. A phyB szerepe a cirkadián óra felé közvetített vörös fény bemenet szabályozásában

Ellentétben a virágzási idő meghatározásában betöltött szerepével, a phyB hatása a cirkadián óra “sebességére” folyamatos vörös fényben arányos a jelenlévő fehérjék mennyiségével: a phyB mutáns hosszú periódusú fenotípust mutat, míg a phyB túltermelők periódushossza rövid (Palagyi és mtsai 2010, Hall és mtsai 2002). Összhangban a becsült phyB Pfr forma mennyiségével, alacsony intenzitású vörös fényben a phyB[S86A] rövidebb, a phyB[S86D] hosszabb periódust mutatott, mint a phyB[WT] növények, ám telítési fényintenzitáson a vonalak periódushossza azonos (9. ábra). Érdeemes megemlíteni, hogy 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ fényintenzitás alatt a phyB[S86D] periódushossza megegyezik a phyB-9 növények esetén kapott értékekkel. Ezzel ellentétben a relatív hipokotil hossza ennek a két vonalnak csak egy nagyságrenddel kisebb vörös fényintenzitáson válik azonossá. (Medzihradsky és mtsai 2013). Ez arra utal, hogy az óra ritmusa kevésbé érzékeny a phyB Pfr forma mennyiségére, szemben a hipokotil megnyúlás szabályozásával. Azt is megfigyeltük, hogy a fényintenzitásválasz görbéje a phyB[S86A] vonalnak kevésbé, míg a phyB[S86D] növényeknek fokozottabban meredek a phyB[WT] vonalához viszonyítva. Ez arra utal, hogy a phyB Ser-86 esetlegesen fényfüggő foszforilációja szerepet játszhat abban a folyamatban, amely során az óra érzékeli a különböző intenzitású fényjeleket.



18. ábra. Egy modell, mely megmutatja a phyB szerepét a CO stabilitásának szabályozásában vad típusú és phyB túltermelő növényekben

Reggel a CO degradációja a jellemző, amelyben a HOS1 (Lazaro és mtsai 2012) és a phyB (Valverde és mtsai 2004) vesznek részt, ahogy ezt a tompa végű piros nyilak is jelzik. A nyilak vastagsága tükrözi a mutatott hatás erősségét. Bár a kísérleti bizonyítékok hiányoznak, de a phyB ezen funkciója vagy egy ismeretlen ubikvitin ligázon vagy a HOS1 fehérjén keresztül valósul meg. Ezt a feltételezett hatást jelöltük zöld szaggatott nyíllal. A phyB túltermelésének valószínűleg nincs érdemi hatása a CO fehérje szintjére ebben a napszakban.

Alkonyatkor és este a phyB CO mennyiségére gyakorolt negatív hatása lecsökken, valószínűleg a PHL fehérjének (Endo és mtsai 2013) hatására. A COP1-SPA1 komplex destabilizálja a CO-t, ám ezt a hatást a fényaktivált fotoreceptorok (CRY1, CRY2 és PHYA) gátolják, így a CO fehérje felhalmozódik (Valverde és mtsai 2004). A phyB kölcsönhat a SPA1 fehérjével, ezáltal szintén gátolja a SPA1-COP1 komplex működését. Mivel ez a hatás erősebb a phyB túltermelő vonalakban, így ebben az időben magasabb CO szintet mérhetünk a phyB fotoreceptor túltermelő növényekben.

Az éjszaka során, ahogy az aktív fotoreceptorok eltűnnek, a COP1-SPA1 komplex hatékonyan bontja a CO fehérjét. Ám a phyB túltermelő vonalakban a tartós és hozzávetőlegesen magas phyB Pfr szint miatt gátlódik a COP1 aktivitása így stabilizálódik a CO fehérje.

Az ábra a hosszú nappalon történő molekuláris eseményeket ábrázolja, ahol a CO mennyisége az este során elég magas ahhoz, indukálja a virágzást vad típusú növényekben is, így a CO mennyiségének további emelkedése a phyB túltermelő növényekben nem gyorsítja jelentősen a folyamatot. Míg rövid nappalon, ahol éjszaka a vad típusú növényekben elhanyagolható a CO fotoreceptorok általi stabilizációja, a phyB túltermelő vonalakban jelentkező szignifikáns emelkedés a CO mennyiségében korai virágzást okoz. Ezek a megfigyelések magyarázzák azt a tényt, hogy a phyB túltermelő vonalak korai virágzás fenotípusa ugyan hosszú- és rövid nappalon is jelen van, mégis az utóbbi esetén a kifejezettebb.

8. Idézett közlemények

1. **Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T** (2005): FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science***309**., 1052-1056
2. **Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP** (2004): Modulation of floral development by a gibberellin- regulated microRNA. *Development* **131**., 3357-65
3. **Ahmad M, Cashmore AR** (1993): HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature***366**., 162-6
4. **Ahn SC, Baek BS, Oh T, Song CS, Chatterjee B** (2000): Rapid mini-scale plasmid isolation for DNA sequencing and restriction mapping. *Bio Techniques***29**.,466-468
5. **Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Mas P, Kay SA** (2001): Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science***293**., 880-883
6. **Allen T, Koustenis A, Theodorou G, Somers DE, Kay SA, Whitelam GC, Devlin PF** (2006):*Arabidopsis* FHY3 specifically gates phytochrome signaling to the circadian clock. *Plant Cell***18** (10):2506-16
7. **Bagnall DJ, King RW, Whitelam GC, Boylan MT, Wagner D, Quail PH** (1995) . Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* **108**: 1495-1503
8. **Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D** (2006): Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet* **2**: e106
9. **Baudry A, Ito S, Song YH, Strait AA, Kiba T, Lu S, Henriques R, Pruneda-Paz JL, Chua NH, Tobin EM, Kay SA, Imaizumi T** (2010): F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control *Arabidopsis* clock progression. *Plant Cell***22**: (3) 606-22
10. **Blázquez MA and Weigel D** (2000): Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature***404** (6780): 889-92
11. **Bünning E.** (1936). Die endogene Tagesjhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft **54**., 590-607.
12. **Castillejo C and Pelaz S** (2008): The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology***18**., 1338-1343
13. **Castillon A, Shen H, Huq E** (2007) Phytochrome Interacting Factors : central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Science* **12** (11):514-21
14. **Cerdan PD, Chory J** (2003): Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**: 881-885
15. **Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S** (1991): The two-hybrid system : a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(21): 9578-82
16. **Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S** (2014): Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiology* **56** (3) 401-13
17. **Clack T, Shokry A, Moffet M, Liu P, Faul M, Sharrock RA** (2009): Obligate heterodimerization of *Arabidopsis* phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* **21**: 786-799
18. **Cloix C and Jenkins GI** (2008): Interaction of the *Arabidopsis* UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. *Mol Plant* **1** (1):118-28
19. **Clough SJ, Bent AF** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **16**: 735-743
20. **Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al** (2007): FT protein movement contributes to long –distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*.*Science* **316**., 1030 1033

21. **Dai S, wei X, Pei L, Thompson RL, Liu Y, Heard JE, Ruff TG, Beachy RN** (2011): BROTHER OF LUX ARRHYTHMO is a component of the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* **23**: (3) 961-972
22. **Devlin PF, Kay SA** (2000): Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* **12**: 2499-2510
23. **Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC** (1998): Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1479-1487
24. **Devlin PF, Robson PR, Patel SR, Goosey L, Sharrock RA, Whitelam GC** (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant physiology* **119**: 909-915
25. **Dixon LE, Knox K, Kozma-Bognar L, Southern MM, Pokhilko A, Millar AJ** (2011): Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in Arabidopsis. *Current Biology* **25**:. 120-125
26. **Edmunds LN** (1988) Cellular and molecular basis of biological clocks. *New York Springer – Verlag*
27. **Endo M, Tanigawa Y, Murakami T, Araki T, Nagatani A** (2013): PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING accelerates flowering through physical interactions with phytochrome B and CONSTANS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 18017-18022
28. **Fankhauser C, Staiger D** (2002): Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana* : light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* **216**:. 1-16
29. **Farinas B, Mas P** (2011): Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation. *The Plant Journal* **66**:. 318-329
30. **Farré EM and Liu T** (2013): The PRR family of transcriptional regulators reflects the complexity and evolution of plant circadian clocks. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: (5) 621-9
31. **Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravecz A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, Seidlitz HK, Nagy F, Ulm R** (2009): Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B – induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **28**: (5) 591-601
32. **Fehér B, Kozma-Bognár L, Kevei E, Hajdu A, Binkert M, Davis SJ, Schafer E, Nagy F** (2011): Functional interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS 8 – controlled UV-B signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* *Plant Journal* **67**:(1) 37-48
33. **Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Ruhl M, Jarillo JA, Coupland G** (2009) . *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell* **17**: 75-86
34. **Franklin KA, Quail PH** (2010): Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* **61**: 11-24
35. **Fujiwara S, Wang L, Han L, Suh SS, Salomé PA, McClung CR, Somers DE** (2008): Post-translational regulation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins. *J Biol Chem* **283**: (34) 23073-83
36. **Geraldo N, Baurle I, Kidou S, Hu X, Dean C** (1999): FRIGIDA delays flowering in *Arabidopsis* via a cotranscriptional mechanism involving direct interaction with the nuclear cap-binding complex. *Plant Physiology* **150**: (3) 1611-8
37. **Hall A, Kozma-Bognar L, Bastow RM, Nagy F, Millar AJ** (2002): Distinct regulation of CAB and PHYB gene expression by similar circadian clocks. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **32**: 529-537
38. **Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* **290**: 2110-2113

39. **Hartmann B, Höhmann S, Nettekheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P** (2000): Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **21**:(4)351-60.
40. **Herrero E, Kolmos E, Bujdoso N, et al.** (2012): EARLY FLOWERING 4 recruitment of EARLY FLOWERING 3 in the nucleus sustains the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **24**., 428-443
41. **Hong S, Song HR, Lutz K, Kerstetter RA, Michael TP, McClung CR** (2010): Type II protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) is required for circadian period determination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: (49) 21211-6
42. **Hsu PY, Devisetty UK, Harmer SL** (2013): Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in *Arabidopsis*. *eLife* **2**, e00473
43. **Huang W, Perez-Garcia P Pokhilko A, Millar AJ, Antosechkin I, Riechmann JL, Mas P** (2012): Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science* **336**., 75-79
44. **Huang X, Ouyang X, Deng XW** (2014): Beyond repression of photomorphogenesis: role switching of COP/DET/FUS in light signaling. *Curr Opin Plant Biol* **21**: 96-103
45. **Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA** (2005): FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* **309**., 293-297
46. **Inigo S, Alvarez MJ, Strasser B, Califano A, Cerdan PD** (2012): PFT1, the MED25 subunit of the plant Mediator complex, promotes flowering through CONSTANS dependent and independent mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **69**: 601-612
47. **Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:(1) 23-8
48. **Ito S, Song YH, Imaizumi T** (2012): LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **5**: 573-582
49. **Jang S, Marchal V, Panigrahi KC, Wenkel S, Soppe W, Deng XW, Valverde F, Coupland G** (2008): *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO Journal* **27**: 1277-1288
50. **Jarillo JA, Capel J, Tang RH, Yang HQ, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001): An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* **410**: 487-490
51. **Johansson M and Staiger D** (2014): Time to flower : interplay between photoperiod and the circadian clock. *Journal of Experimental Botany* **66**(3):719-730
52. **Johnson CH, Golden SS, Kondo T** (1998): Adaptive significance of circadian program sin cyanobacteria. *Trend sin microbiology* , **6**: (10) 407-10
53. **Jones MA, Williams BA, McNicol J, Simpson CG, Brown JW, Harmer SL** (2012): Mutation of *Arabidopsis* spliceosomal timekeeper locus causes circadian clock defects. *Plant Cell* **24**: (10) 4066-82
54. **Kevei E, Gyula P, Feher B, Toth R, Viczian A, Kircher S, Rea D, Dorjgotov D, Schafer E, Millar AJ, Kozma-Bognar L, Nagy F** (2007): *Arabidopsis thaliana* circadian clock is regulated by the small GTPase LIP1. *Curr Biol* **17**: 1456-1464
55. **Kevei E, Gyula P, Hall A, Kozma-Bognar L, Kim WY, Eriksson ME, Toth R, Hanano S, Feher B, Southern MM, Bastow RM, Viczian A, Hibberd V, Davis SJ, Somers DE, Nagy F, Millar AJ** (2006): Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of ZEITLUPE. *Plant Physioogyl* **140**: 933-945
56. **Kevei E, Schafer E, Nagy F** (2007): Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *J Exp Bot* **58** (12): 3113-24
57. **Kim J, Geng R, Gallenstein RA, Somers DE** (2013): The F-box protein ZEITLUPE controls stability and nucleocytoplasmic partitioning of GIGANTEA. *Development* **140**., 4060-4069

58. **Kim Y, Lim J, Yeom M, Kim H, Kim J, Wang L, Kim Woe Y, Somers David E, Nam Hong G** (2013): ELF4 regulates GIGANTEA chromatin access through subnuclear sequestration. *Cell Reports* **3**:, 671-677
59. **Kozma-Bognár L and Káldi K** (2008): Synchronization of the fungal and the plant circadian clock by light *Chembiochem* **9** (16):2565 – 73
60. **Kumimoto RW, Adam L, Hymus GJ, Repetti PP, Reuber TL, Marion CM, Hempel FD, Ratcliffe OJ** (2008): The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in *Arabidopsis*. *Planta* **228** (5):709-23
61. **Lau Os, Huang X, Charron J-B, Lee J-H, Li G, Deng XW** (2011): interaction of *Arabidopsis* DET1 with CCA1 and LHY in mediating transcriptional repression in the plant circadian clock. *Molecular Cell* **43**:, 703-712
62. **Laubinger S, Marchal V, Le Gourrierec J, Wenkel S, Adrian J, Jang S, Kulajta C, Braun H, Coupland G, Hoecker U** (2006): *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* **133**: 3213-3222
63. **Lazaro A, Valverde F, Pineiro M, Jarillo JA** (2012): The *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates CONSTANS abundance in the photoperiodic control of flowering. *Plant Cell* **24**: 982-999
64. **Lee JH, Yoo SJ, Park SH, Hwang I, Lee JS, Ahn JH** (2007): Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **21**(4):397-402
65. **Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H** (2008): A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **15**:, 110-120.
66. **Li F, Sun J, Wang D, Bai S, Clarke AK, Holm M** (2014): The B-Box Family Gene STO (BBX24) in *Arabidopsis thaliana* regulates flowering time in different pathways. *PLOS One* **9**, e87544
67. **Li QH, Yang HQ** (2007): Cryptochrome signaling in plants. *Photochem Photobiol* **83** (1):94-101
68. **Li X, Wang Q, Yu X, Liu H, Yang H, Zhao C, Liu X, Tan C, Klejnot J, Zhong D, Lin C** (2011): *Arabidopsis* cryptochrome 2 (CRY2) functions by the photoactivation mechanism distinct from the tryptophan (trp) triad-dependent photoreduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **108** (51): 20844-9
69. **Lian HL, He SB, Zhang YC, Zhu DM, Zhang JY, Jia KP, Sun SX, Li L, Yang HQ** (2011): Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Dev* **25**: 1023-1028
70. **Lin R, Ding L, Casola C, Ripoll DR, Feschotte C, Wang H** (2007): Transposase – derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **318** (5854): 1302-5
71. **Liu B, Zuo Z, Liu H, Liu X, Lin C** (2011): *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev* **25**(10): 1029-34
72. **Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C** (2011): The action mechanism of plant cryptochromes. *Trends Plant Science* **16** (12): 684-91
73. **Liu P, Sharrock RA** (2013): Directed dimerization : an in vivo expression system for functional studies of type II phytochromes. *Plant Journal* **75**: (6) 916-26
74. **Locke JC, Southern MM, Kozma-Bognar L, Hibberd V, Brown PE, Turner MS, Millar AJ** (2005): Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol* **1**: 2005 0013
75. **Lu SX, Knowles SM, Andronis C, Ong MS, Tobin EM** (2009): CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL function synergistically in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **150**: (2) 834-43

76. **Lu SX, Webb CJ, Knowless SM, Kim SH, Wang ZY, Tobin EM** (2012): CCA1 and ELF3 interact in the control of hypocotyl length and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **158**:, 1079-1088
77. **Lu XD, Zhou CM, Xu PB, Luo Q, Lian HL, Yang HQ** (2015): Red-light-dependent interaction of phyB with SPA1 promotes COP1-SPA1 dissociation and photomorphogenic development in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **8**: 467-478
78. **Ma L, Gao Y, Qu L, Chen Z, Li J, Zhao H, Deng XW** (2002): Genomic evidence for COP1 as a repressor of light – regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: (10) 2383-98
79. **Más P, Devlin PF, Panda S, Kay SA** (2000): Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408** (6809):207-11
80. **Mas P, Kim WY, Somers DE, Kay SA** (2003): Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **426**: , 567-570
81. **Mathieu J, Warthman N, Kuttner F, Schmid M** (2007): Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current Biology* **17**:, 1055-1060
82. **McClung CR** 2013: Beyond *Arabidopsis*: the circadian clock in non-model plant species. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **24**:, 430-436
83. **McNellis TW, von Arnim AG, Araki T, Komeda Y, Miséra S, Deng XW** (1994): Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell* **6**: 487-500
84. **Medzihradzsky M, Bindics J, Adam E, Viczian A, Klement E, Lorrain S, Gyula P, Merai Z, Fankhauser C, Medzihradzsky KF, Kunkel T, Schafer E, Nagy F** (2013): Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 535-544
85. **Merrow MW, Garceau NY, Dunlap JC** (1997): Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **94**(8): 3877-82
86. **Michaels SD and Amasino RM** (1999): The gibberellic acid biosynthesis mutant gal-3 of *Arabidopsis thaliana* is responsive to vernalization. *Dev Genet* **25**:(3) 194-8
87. **Morris K, Thornber S, Codrai L, Richardson C, Craig A, Sadanandom A, Thomas B, Jackson S** (2010): DAY NEUTRAL FLOWERING represses CONSTANS to prevent *Arabidopsis* flowering early in short days. *Plant Cell* **22**(4):1118-28
88. **Nagel DH and Kay SA** (2012): Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Current Biology* **22**: (16) R648-57
89. **Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, Mizuno T, Chua NH, Sakakibara H** (2010): PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **22**:, 594-605
90. **Nakamichi N, Kiba T, Kamioka M, Suzuki T, Yamashino T, Higashiyama T, Sakakibara H, Mizuno T** (2012): Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: (42) 17123-8
91. **Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN** (2007): Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448** (7151):358-61
92. **Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farre EM, Kay SA** (2011): The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* **475**:, 398-402
93. **Ordóñez-Herrera N, Fackendahl P, Yu X, Schaefer S, Koncz C, Hoecker U** (2015): A cop1 spa mutant deficient in COP1 and SPA proteins reveals partial co-action of COP1 and SPA during *Arabidopsis* post-embryonic development and photomorphogenesis. *Mol Plant* **8**: 479-481
94. **Palagyi A, Terecskei K, Adam E, Kevei E, Kircher S, Merai Z, Schafer E, Nagy F, Kozma-Bognár L** (2010): Functional analysis of amino-terminal domains of the photoreceptor phytochrome B. *Plant Physiol* **153**: 1834-1845

95. **Pittendrigh CS, Minis** (1964) The Entrainment of Circadian Oscillations by Skeleton Photoperiods. *Science* **144**: 565
96. **Pope B and Kent HM** (1996): High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **24**: (3)536-7
97. **Pruneda-Paz JL, Breton G, Para A, Kay SA** (2009): A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **323**: (5920) 1481-5
98. **Rawat R, Takahashi N, Hsu PY, Jones MA, Schwartz J, Salemi MR, Phinney BS, Harmer SL** (2011): REVEILLE8 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 form a negative feedback loop within the *Arabidopsis* circadian clock. *PLOS Genet* **7**:, e1001350
99. **Reed JW, Chory J** (1994) . Mutational analyses of light-controlled seedling development in *Arabidopsis*. *Seminars in cell biology* **5**: 327-334
100. **Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schafer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R** (2011): Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science* **332** (6025): 103-6
101. **Rugnone ML, Faigan Soverna A, Sanchez SE, et al.** (2013): LNK genes integrate light and clock signaling networks at the core of the *Arabidopsis* oscillator. *Proceedings of the National Academy of Sciences , USA* **110**., 12120-12125
102. **Salome PA, Michael TP, Kearns EV, Fett-Neto AG, Sharrock RA, McClung CR** (2002): The out of phase 1 mutant defines a role for PHYB in circadian phase control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 1674-1685
103. **Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G** (2000): Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613-1616
104. **Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, Zhang X, Rugnone ML, Hernando CE, Cuevas JC, Godoy Herz MA, Depetris-Chauvin A, Simpson CG, Brown JW, Cerdán PD, Borevitz JO, Mas P, Ceriani MF, Kornblihtt AR, Yanovsky MJ** (2010): A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature* **468**: (7320) 112-6
105. **Sawa M and Kay SA** (2011): GIGANTEA directly activates flowering locus T in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**. 11698-11703
106. **Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T** (2007): FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* **318**: 261-265
107. **Schrader A and Uhrig J** (2013): MIDGET cooperates with COP1 and SPA1 to repress flowering in *Arabidopsis thaliana* . *Plant Signaling and Behavior* **8**., e25600
108. **Sheerin DJ, Menon C, zur Oven-Krockhaus S, Enderle B, Zhu L, Johnen P, Schleifenbaum F, Stierhof YD, Huq E, Hiltbrunner A** (2015): Light-activated phytochrome A and B interact with members of the SPA family to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis* by reorganizing the COP1/SPA complex. *Plant Cell* **27**: 189-201
109. **Simpson GG** (2004): The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Current Opin Plant Biol.* **7** (5): 570 -4
110. **Song YH, Estrada DA, Johnson RS, Kim SK, Lee SY, MacCoss MJ, Imaizumi T** (2014) Distinct roles of FKF1, Gigantea, and Zeitlupe proteins in the regulation of Constans stability in *Arabidopsis* photoperiodic flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 17672-17677
111. **Song YH, Smith RW, To BJ, Millar AJ, Imaizumi T** (2012): FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* **336**: 1045-1049

112. **Song YH, Smith RW, To BJ, Millar AJ, Imaizumi T** (2012): FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* **336**: 1045-1049
113. **Srikanth A and Schmid M** (2011): Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol LifeScience* **68** (12): 2013-37
114. **Staiger D, Allenbach L, Salathia N, fiechter V, Davis SJ, Millar AJ, Chory J, Fankhauser C** (2003): The Arabidopsis SRR1 gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes and Development* **17**., 256-268
115. **Staiger D, Shin J, Johansson M, Davis SJ** (2013): The circadian clock goes genomic. *Genome Biology* **14**., 208.
116. **Steinbach Y and Henning L** (2014): *Arabidopsis* MSI1 functions in photoperiodic flowering time control. *Frontiers in Plant Science* **5**., 77.
117. **Su YS, Lagarias JC** (2007): Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of Arabidopsis phytochromes in transgenic plants. *Plant Cell* **19**: 2124-2139
118. **Takase T, Nishiyama Y, Tanihigashi H, Ogura Y, Miyazaki Y, Yamada Y, Kiyosue T** (2011): LOV KELCH PROTEIN 2 and ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1. *Plant Journal* **67** (4):608-21
119. **Tiwari SB, Shen Y, Chang HC, et al.** (2010): The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytologist* **187**: 57-66
120. **Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G** (2004): Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003-1006
121. **Wang G, Wang J-W** (2013): Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife* **2**., e00269
122. **Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY, Deng XW** (2001): Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* **294** : (5540) 154-8
123. **Wang L, Fujiwara S, Somers DE** (2010): PRR5 regulates phosphorylation, nuclear import and subnuclear localization of TOC1 in the *Arabidopsis* circadian clock. *EMBO Journal* **29**., 1903-1915
124. **Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierc J, samach A, Coupland G** (2006): CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18** ., 2971-2984
125. **Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D** (2005): integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: (5737) 1056-9
126. **Yakir E, Hilman D, Kron I, Hassidim M, Melamed-Book N, Green RM** (2009): Posttranslational regulation of CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 in the circadian oscillator of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **150**: (2) 844-57
127. **Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T** (2005): TWIN SISTER OFF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant and Cell Physiology* **46**., 1175-1189
128. **Yanovsky MJ, Kay SA** (2002): Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**: 308-312
129. **Yoo SK, Chung KS, Kim J, Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH** (2005): CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 770-778
130. **Yu JW, Rubio V, Lee NY, Bai S, Lee SY, Kim SS, Liu L, Zhang Y, Irigoyen ML, Sullivan JA, Lee I, Xie Q, Paek NC, Deng XW** (2008): COP1 and ELF3 control

- circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Mol Cell* **32**:, 617-630
131. **Zuo Z, Liu H, Liu B, Liu X, Lin C** (2011): Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in *Arabidopsis*. *Current Biology* **21**: 841-847

9. Saját közlemények

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

Hajdu A, Ádám É, Sheerin DJ, Dobos O, Bernula P, Hiltbrunner A, Kozma-Bognár L, Nagy F (2015): High-level expression and phosphorylation of phytochrome B modulates flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Journal* doi: 10.1111/tpj.12926
IF: 5.972

Egyéb közlemények:

Ádám É, Hajdu A, Nagy F, Viczián A (2015) : Optogenetics: past, present and future. *Acta Biologica Szegediensis* **59** (Suppl.1): 2015

Kozma-Bognár L, Hajdu A, Nagy F. (2012) : Light-regulated gene expression in yeast. *Methods in Molecular Biology*. **813**:187-93.

Fehér B, Kozma-Bognár L, Kevei E, Hajdu A, Binkert M, Davis SJ, Schäfer E, Ulm R, Nagy F. (2011) :Functional 8-controlled interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE LOCUS UV-B signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. **67**:37-48
IF: 6.16

Sorokina O*, Kapus A*, Terecskei K, Dixon LE, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar AJ.(2009) : A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast. *Journal of Biological Engineering*.17;3:15
IF: 2.481

* Megosztott első szerző

10. Összefoglalás

Minden élőlény számára esszenciális a reprodukció megfelelő időzítése, különösen igaz ez a helyhez kötött életmódot folytató organizmusok (pl.: növények) esetében. A virágzási idő meghatározásában a megfelelő fejlődési stádiumon kívül jelentős szerep jut a külső környezeti hatásoknak, mint a nappal hosszúsága, a fény minősége vagy az abiotikus stressz. Számos növény esetében a nappal hosszúsága az a külső paraméter, amely elindítja a magképzéshez vezető folyamatokat. Az *Arabidopsis thaliana* egy fakultatív hosszú nappalos növény, ami azt jelenti, hogy a virágzás sokkal hamarabb megtörténik hosszú nappalon (16 óra fény/ 8 óra sötét), mint rövid nappalon (8 óra fény/ 16 óra sötét). A fotoperiodikus idő mérése Arabidopsisban a belső cirkadián óra és a külső környezeti fényjelek közötti interakción alapul, amelynek közvetítői speciális fotoreceptorok.

A cirkadián óra ritmikusan szabályozza a *CONSTANS* (*CO*) transzkripcióját, oly módon, hogy a *CO* expresszió maximuma csak hosszú nappalon, akkor is az esti órákban esik megvilágított napszakra. Ekkor, a fény jelenlétében, a fitokrómA (*phyA*) és kriptokróm 1-2 (*CRY1* és *CRY2*) stabilizálja a *CO* fehérjét azáltal, hogy gátolja a *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1* (*COP1*) E3 ubikvitin ligáz működését. Ezen fotoreceptorok akciós spektrumából következik, hogy a távoli vörös és a kék fény a leghatékonyabb ebben a folyamatban. Ezzel ellentétben a *phyB* – a fényen nőtt növények esetén a domináns vörös fényt elnyelő fotoreceptor – indukálja a *CO* degradációját a nappal első felében, azáltal, hogy egy eddig még ismeretlen ubikvitin ligázot aktivál. Ezeknek a hatásoknak az eredménye a *CO* fehérje felhalmozódása az este során hosszú nappalos körülmények között.

A *CO* egy „zinc-finger-box” típusú transzkripciós faktor, ami indukálni képes a *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) transzkripcióját. Az *FT* fehérjéről állapították meg, hogy ez a régóta keresett ún. florigén, amely a levélben keletkezik, de az apikális hajtásmerisztémába vándorol a floémen keresztül, ahol indukálja a vegetatív állapotból a reprodukzív állapotba való áttérést, azáltal, hogy virág merisztéma azonossági géneket aktivál. A virágzás fotoperiodikus szabályozását befolyásolják a cirkadián óra és/vagy a fotoreceptorok funkciójának változásai. Például egy rövid periódusú cirkadián óra mutáns korai fázisú cirkadián ritmusokat mutat fény/sötét ciklusokon. Az ilyen mutánsok többsége korán virágzik rövid nappalon, mert a *CO* transzkripciójának a maximuma eltolódik az éjszakából a megelőző nappal időszakába, ezáltal lehetővé téve

a phyA/CRY1/CRY2 általi stabilizálódását a CO fehérjének, ami így indukálni képes az *FT* transzkripcióját. Másrészt a phyA vagy CRY1-2 hiányos mutáns növények később virágoznak hosszú nappalon, a CO stabilizációjának a hiánya miatt. A *phyB* mutánsok viszont korábban virágoznak, ami a felhalmozódó CO fehérjének és a nappal során magas *FT* transzkripciós szintnek köszönhető.

Már régóta ismert tény, hogy a phyB túltermelése korai virágzást eredményez kifejezetten rövid nappalon, ami ellentétben áll a fotoreceptor virágzás szabályozásában betöltött, jól meghatározott szerepével. A munkánk elsődleges célja az volt, hogy magyarázatot keressünk erre a problémára, azáltal hogy leleplezzük a molekuláris mechanizmust, amely alapján a phyB túltermelése korai virágzást eredményez.

Ismert, hogy a phyB túltermelése fényfüggő módon gyorsítja a cirkadián órát (rövidíti a periódushosszt). Megmutattuk, hogy ez a hatás kifejezetten vörös fényre igaz, és nem eredményez korai fázist fehér fény/sötét ciklusokon, ahol a korai virágzás fenotípus egyértelműen látható. Így eredményeink kizárják azt a lehetőséget, hogy az óra egy megváltozott funkciója lenne felelős ezért a virágzás fenotípusért.

A következő lépésben meghatároztuk a *CO* és *FT* mRNS mennyiségének alakulását rövid és hosszú nappalon. A phyB túltermelésének nem volt hatása a *CO* mRNS szintjére, ám indukálta az *FT* transzkripcióját alkonyatkor és az éjszaka során. Az *FT* transzkripciójának megemelkedése a rövid nappalos éjszaka során igen jelentős mértékű a vad típusú növényekben kapott értékekhez képest. A phyB-t az *ft-10* mutáns háttérben túltermelő növények vizsgálatakor kiderült, hogy a phyB túltermelésének virágzásra gyakorolt hatását teljesen eltünteti az *ft-10* mutáció. Ez alátámasztotta azt, hogy a phyB túltermelő növények korai virágzás fenotípusa az *FT* expressziójának a megváltozásával magyarázható. Érdekességgéppen elmondható, hogy a *phyB* mutáns növények korai virágzása is a megemelkedett *FT* transzkripciónak köszönhető, ám ebben az esetben ez a nappal időszakára korlátozódik, míg a túltermelő növények esetén az alkonyat és az éjszaka során tapasztalt megemelkedett *FT* kifejeződés a felelős a fenotípusért.

Mivel az *FT* fő aktivátora CO, phyB túltermelő ([WT], [S86A] vagy [S86D]) *co-9* dupla mutáns növényeket hoztunk létre, hogy ellenőrizzük, vajon a CO szükséges-e a phyB túltermelő növények molekuláris és fiziológiai virágzás fenotípusához. Mind a korai virágzás, mind az *FT* éjszakai indukciója megszűnt a *co-9* mutáns növényekben, igazolva hogy a phyB magas szintje a CO fehérjén keresztül aktiválja az *FT* transzkripciót. Mivel a *CO* transzkripcióban nem történt változás, így levonhatjuk azt a

következtetést, hogy a phyB túltermelése fokozza a CO funkcióját poszttranszkripció szinten, valószínűleg a CO fehérje stabilizálása által.

Sötétben a fitokrómok inaktív, vörös fényt ($\lambda_{\text{max}}=600$ nm) elnyelő formában vannak jelen (Pr forma), ami vörös fény hatására átalakul biológiailag aktív, távoli vörös ($\lambda_{\text{max}}=730$ nm) fényt elnyelő formába (Pfr forma). Az aktív Pfr forma azonnal és hatékonyan alakul vissza inaktív Pr formába távoli vörös fény hatására (fotokonverzió), vagy egy lassabb, fénytől független folyamat során, amit sötét reverziónak neveznek. Vad típusú növényekben a phyB indukálja a CO degradációját vörös fénytől függő módon (azaz Pfr formájától függő módon), a nappal első felében. Különböző megközelítéseket használva vizsgáltuk meg, hogy a phyB túltermelésének hatása is Pfr forma függő-e. Először „end-of-the-day” EOD távoli vörös kezelést alkalmaztunk a rövid nappal végén, hogy eltüntessük a Pfr formákat még az éjszakát megelőzően. A kezelés hatására a phyB túltermelő vonalakban erősen lecsökkent az *FTmRNS* szintje az éjszaka során, valamint az alkonyatkor mérhető expressziós csúcs mérete is kisebb lett, alátámasztva, hogy az *FT* szabályozása ezekben az időszakokban a túltermelt phyB Pfr formának köszönhető. Következő lépésben megvizsgáltuk a molekuláris és fiziológiai fenotípusát olyan phyB túltermelő transzgenikus vonalaknak, amelyekben kondicionálisan vagy konstitutívan változik a phyB Pfr mennyisége. A phyB Ser-86 aminosav foszforilációja gyorsítja a receptor sötét reverziónát, ami negatívan befolyásolja a jelátvitelt nem telítési fényintenzitáson. Rövid nappalon, a phyB[S86A] - nem foszforilálható mutánsphyB-t túltermelő-növényekben az éjszaka során magasabb *FT* indukciót kaptunk, és korábban is virágoztak, mint a phyB[WT] -vad típusú phyB-t túltermelő - növények. Ezzel szemben alkonyatkor a phyB[S86D]- állandó foszforilált állapotot utánzó mutáns phyB-t túltermelő) - növényekben látható *FTmRNS* emelkedés megegyezik a phyB[WT] és phyB[S86A] vonalakban kapott szinttel, ám az éjszakai *FT* maximum teljesen hiányzik a phyB[S86D] növényekből. Megjegyezendő, hogy a phyB[S86D] növények sokkal később (44 levéllel) virágoztak, mint a phyB[WT] (23 levéllel) vagy a phyB[S86A] (17 levéllel) vonalak, ám korábban, mint a Col vad típusú(54 levél) növények. Ezekből az adatokból következik, hogy az *FT*éjszakai indukciója a legfontosabb tényező a phyB túltermelő vonalak rövid nappalon megfigyelhető korai virágzás fenotípusának kialakításában. Hosszú nappalon, minden phyB túltermelő vonal hasonló *FTmRNS* szintet mutat alkonyatkor, ami megközelítőleg kétszer nagyobb, mint a Col esetén kapott szintek. Az *FT* szint emelkedett marad a phyB[WT] és phyB[S86A] növényekben az éjszaka során, de jelentősen lecsökkent a

phyB[S86D] vonalakban. Mivel minden túltermelő vonal hasonló időben virágzott és korábban, mint a Col növények, azt mondhatjuk, hogy az alkonyatkor megemelkedett *FT* expresszió a legmeghatározóbb tényező a korai virágzás kialakításában hosszú nappalon és az *FT* tartósan magas szintje az éjszaka során nem járul hozzá jelentősen a fenotípushoz. Rövid- és hosszú nappalos körülmények között is, a fény periódus alatt a növények telítési fényintenzitásnak voltak kitéve, ezáltal megközelítőleg azonos mennyiségű Pfr képződött a nappal végére minden vonalban, ami nagyon hasonló *FT* indukciót eredményezett alkonyatkor. A sötét periódus alatt, a phyB Pfr formák mennyisége gyorsan csökkent a phyB[S86D] növényekben, a gyorsabb sötét reverzió miatt, hosszú és rövid nappalon egyaránt. A Pfr formák mennyiségének a csökkenése lassabb volt a phyB[WT] esetén, de a leglassabb a phyB[S86A] növényekben volt. Így az *FT* mRNS mennyisége az éjszaka során alacsony volt a phyB[S86D] esetén, viszont magas volt phyB[WT] és phyB[S86A] növényekben. Mindent egybevetve az *FT*mRNS felhalmozódása összhangban van a várt Pfr szintekkel a különböző vonalakban és különböző körülmények között.

A phyB[Y276H] növények olyan phyB fotoreceptort expresszálnak, amely folyamatosan aktív Pfr formában van, míg a phyB[C357T] vonalaka kromofór kötésére képtelen, folyamatosan inaktív Pr formáját fejezik ki a phyB fotoreceptornak, mindkét esetben függetlenül a fényviszonyoktól. A phyB[Y276H] az *FT*expressziós profil és virágzási idő tekintetében is hasonló eredményt adott, mint a phyB[S86A], míg a phyB[C357T] növények úgy viselkedtek, mint a *phyB-9* mutáns, megerősítve ezzel a phyB Pfr forma szükségességét a phyB túltermelő növények korai virágzásának fenotípusának kialakulásához.

Az adataink alapján, a phyB Pfr forma nagy mennyisége feltehetően stabilizálja a CO fehérjét alkonyatkor és az éjszaka során. A COP1-SPA ubikvitin ligáz komplex fontos szerepet játszik a CO fehérje szint szabályozásában, ezekben az időszakokban. A négy SPA fehérje (SPA1-SPA4) jelentősen fokozza a COP1 ubikvitin ligáz aktivitását fizikai kölcsönhatás révén. A virágzás szabályozásában aSPA1 és a SPA4 játszik igazán fontos szerepet. A *cop1* és *spa* mutánsok kifejezetten rövid nappalon korábban virágoznak, és alkonyatkor, valamint részben az éjszaka során megemelkedett CO fehérje és az *FT* mRNS szint mérhető ezekben a mutánsokban. Ezek a fenotípusok minőségileg nagyon hasonlóak azokhoz, amiket a phyB túltermelő vonalak esetében tapasztalunk, ami felvetette annak lehetőségét, hogy a phyB Pfr formája a COP1-SPA komplex részleges gátlása révén sietteti a virágzást. A közelmúltban vált ismertté, hogy a phyA és phyB

Pfr formája képes kötődni a SPA1 fehérjéhez, ezáltal gátolva a COP1-SPA interakciót, amely a COP1 aktivitásának csökkenését, majd a COP1 célfehérjéinek (HFR1, HY5) a felszabadulását eredményezi. Élesztő két hibrid rendszert és limitált Pfr mennyiséget eredményező fényintenzitást alkalmazva megmutattuk, hogy a SPA1 kötési hatékonysága a vad típusú vagy foszdomutáns phyB túltermelőkhöz szoros összefüggést mutat az éjszaka mért *FT* mRNS szintekkel az adott túltermelő vonalakban. Ez megerősíti azt, hogy a túltermelt Pfr formájú phyB szabályozza a CO fehérje szinteket és a virágzási időt, azáltal, hogy gyengíti a COP1-SPA interakciót. Ezzel ellentétben, a vad típusú növényben a phyB Pfr formája indukálja a CO degradációját a nappal során. Mivel a CO ebben az időszakban ubikvitinálódik és lebomlik a proteoszómában, így a phyB ezen hatása egy ismeretlen ubikvitin ligáz phyB általi pozitív szabályozásán keresztül valósul meg.

Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy a phyB fotoreceptor szerteágazó hatásának a CO stabilitás meghatározásában három fő aspektusa van: a napszak, a phyB Pfr mennyisége és egy a phyB Pfr által vezérelt ubikvitin ligáz. A nap első felében a phyB indukálja a CO fehérje degradációját, függetlenül attól, hogy a phyB endogén (vad típusú), vagy túltermelt szinten van jelen. Ebben az időszakban a phyB valószínűleg fokozza a működését egy ismeretlen ubikvitin ligáznak, ami a CO stabilitás szempontjából sokkal jelentősebb esemény, mint a COP1-SPA1 komplex gátlása a phyB által. A nap második felében és alkonyat körül az ismeretlen ubikvitin ligáz szerepe lesz elhanyagolható, ami legalább részben a PHL fehérjének köszönhető, ellensúlyozván a phyB hatását. Jóllehet a megemelkedett *FT* szint a *phyB-9* növényekben a nap második felében azt jelzi, hogy ez a hatás még nem teljesen hiányzik. A phyB túltermelése inkább indukálja, mint csökkenti az *FT* mRNS szintjét, indukálva ezzel a COP1-SPA1 komplex gátlásán keresztül érvényesülő fokozódó CO-stabilizáló hatás megjelenését. Éjszaka a COP1-SPA1 komplex hatása érvényesül leginkább a CO stabilitásán, így a phyB túltermelése erős *FT* indukciót eredményez, míg vad típusú növényekben az endogén phyB Pfr szintje valószínűleg nem elégséges ahhoz, hogy jelentős hatással legyen a COP1-SPA1 komplexre.

Ellentétben a virágzási idő meghatározásában betöltött szerepével, a phyB hatása a cirkadián óra működésére folyamatos vörös fényben arányos a phyB fehérjék mennyiségével: a phyB mutáns hosszú periódusú fenotípust mutat, míg a phyB túltermelők periódushossza rövid. Összhangban a becsült phyB Pfr forma mennyiségével, alacsony intenzitású vörös fényben a phyB[S86A] rövidebb, a

phyB[S86D] hosszabb periódust mutatott, mint a phyB[WT] növények, ám telítési fényintenzitáson a vonalak periódushossza azonos volt. Érdeemes megemlíteni, hogy 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ fényintenzitás alatt a phyB[S86D] periódushossza megegyezik a *phyB-9* növények esetén kapott értékekkel. Ezzel ellentétben a relatív hipokotil hossza ennek a két vonalnak csak egy nagyságrenddel alacsonyabb vörös fényintenzitáson válik azonossá. Ez arra utal, hogy az óra működése kevésbé érzékeny a phyB Pfr forma mennyiségére, szemben a hipokotil megnyúlás szabályozásával.

11. Summary

Timing of reproduction is vital for any living creatures, but is particularly important for sessile organisms, like plants. Flowering is regulated by developmental signals, but also by environmental cues like day length, quality of light or abiotic stress. Many plants use day length as an indicator of the actual season of the year, to be preferred or avoided as the time to set seeds. *Arabidopsis thaliana* is a facultative long day plant meaning that flowering is initiated much earlier in long day (LD) conditions (e.g. 16 h light / 8 h dark cycles) than in short day (SD) conditions (e.g. 8 h light / 16 h dark cycles). Photoperiodic time measurement in *Arabidopsis* is based on the functional interaction of the endogenous circadian clock and environmental light signals mediated by special photoreceptors.

The circadian clock rhythmically regulates the transcription of *CONSTANS* (*CO*) in a way that high level of *CO* expression coincides with light only in the evenings of long days. At this time of the day, photoreceptors phytochrome A (phyA) and cryptochromes (CRY1 and CRY2) stabilize the CO protein by inhibiting the function of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) E3 ubiquitin ligase. Consistent with the action spectra of these receptors, far-red and blue light are the most effective in this process. In contrast, phyB, the dominant red light-absorbing receptor in light-grown plants, promotes degradation of CO during the first half of the day most probably by enhancing the activity of a yet unidentified ubiquitin ligase. The net effect of these regulatory processes is the accumulation of CO proteins in the evening of long days. CO is a Zinc-finger B-box type transcription factor that induces the expression of *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). The FT protein is considered as the long-sought florigen, which is produced in the leaves, but moves to the shoot apical meristem through the phloem to the shoot apical meristem, where it promotes the transition from the vegetative to reproductive state by the activation of floral integrator genes. The photoperiodic regulation of flowering can be affected by alterations in the function of the circadian clock and/or the photoreceptors. For example, short period clock mutants show an early phase of circadian rhythms in light/dark cycles. Most of these mutants flower early in SD conditions, because the peak of rhythmic CO transcription is shifted from the night to the daytime allowing phyA/CRY1-2-dependent stabilization of CO and subsequent activation of *FT*. On the other hand, mutants lacking phyA or CRY1-2

function flower late in LD conditions, because of the absence of CO stabilization. In *phyB* mutants, however, flowering is accelerated, that is caused by accumulation of CO and high-level transcription of *FT* during the day.

It has been known for two decades that overexpression of *phyB* results in early flowering especially in SD conditions that is in sharp contrast to the well-defined role of the receptor in the regulation of flowering. The primary aim of our work was to solve this paradox by revealing the molecular mechanism by which *phyB* overexpression accelerates flowering.

phyB overexpression has been known to accelerate the clock (i.e. shortening periods) in a light dependent manner. We showed that this effect is specific for red light and does not result in early phasing of circadian rhythms in white light/dark cycles, where the early flowering phenotype is clearly detectable. Therefore, our results ruled out altered clock function as the potential cause of early flowering of *phyB* overexpressors.

In the next step, mRNA accumulation patterns of *CO* and *FT* were determined in SD and LD conditions. Overexpression of *phyB* had no effect on *CO* mRNA levels, but induced *FT* expression around dusk and during the night. The increase of *FT* mRNA in the *phyB* overexpressing lines, as compared to that in the wild type, was most dramatic in the night of SD conditions. Analysis of *phyB*-OX *ft-10* double mutant plants showed that the effect of *phyB* overexpression on flowering time was completely suppressed by the *ft-10* mutation. This finding strongly suggested that elevated expression of *FT* underlies the early flowering phenotype of *phyB* overexpressors. Interestingly, early flowering of *phyB* mutants is also mediated by increased *FT* transcription, but this effect is limited to the daytime; in contrast to the effect of *phyB* overexpression on *FT* mRNA levels that is detected around dusk and in the night.

Since CO is the main activator of *FT*, we created *phyB*-OX *co-9* double mutant plants to test if CO is required for the molecular and physiological flowering phenotypes of *phyB* overexpressors. Both early flowering and the induction of *FT* were diminished by the *co-9* mutation demonstrating that high levels of *phyB* up-regulate *FT* through CO. Since CO transcription was unaffected, we concluded that *phyB* overexpression enhances the function of CO at the post-translational level, most likely by stabilizing the CO protein.

In the dark, phytochromes are present in the inactive red light ($\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$) absorbing form (Pr), which is converted to the biologically active far-red light ($\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$) absorbing conformer (Pfr) upon red light irradiation. The active Pfr form is

promptly and effectively converted back to the inactive Pr form by absorbing far-red light (photoconversion), or by a slower, light independent relaxation process called dark reversion. In wild type plants phyB facilitates degradation of CO in a red light dependent (i.e. Pfr-dependent) manner in the first half of the day. We employed parallel approaches to see if the effect of overexpressed phyB is also Pfr-dependent. First, we applied end-of-day far-red (EODFR) treatments in order to eliminate Pfr forms at the end of the photoperiod of a short day. The treatment diminished accumulation of *FT* mRNA in the night and significantly reduced the peak of *FT* expression at dusk, verifying that up-regulation of *FT* at these times was due to overexpressed phyB Pfr.

Second, we analyzed the molecular and physiological phenotypes of transgenic lines overexpressing mutant versions of phyB with conditionally or constitutively altered Pfr levels. Phosphorylation of phyB at Ser-86 has been shown to accelerate dark reversion of the receptor that affects signaling under non-saturating light conditions. In SD conditions, phyB[S86A] plants showed slightly higher induction of *FT* at night and flowered earlier than phyB[WT] plants. In contrast, phyB[S86D] plants displayed the same increase in *FT* mRNA levels at dusk as phyB[WT] and phyB[S86A] plants, but the peak of *FT* in the night was completely missing. Accordingly, phyB[S86D] plants flowered much later (44 leaves) than phyB[WT] (23 leaves) or phyB[S86A] (17 leaves), but earlier than Col wild type plants (54 leaves). These data indicate that induction of *FT* expression in the night plays the major role in early flowering of phyB overexpressors in SD conditions. In LD conditions, all phyB overexpressing plants displayed similar *FT* mRNA levels at dusk that were about 2-fold higher than that in Col plants. *FT* levels stayed high in phyB[WT] and phyB[S86A] plants during the night, but dropped rapidly in phyB[S86D]. Since all phyB overexpressing lines flowered at the same time and earlier than Col plants, we concluded that elevated expression of *FT* at dusk is the main determinant of early flowering in LDs and persisting high levels of *FT* mRNA in the night do not contribute significantly to the phenotype. During the photoperiod of both SD and LD conditions plants were exposed to saturating fluences of light producing roughly equal amounts of Pfr by the end of the light phase in all lines that is reflected in very similar induction of *FT* around dusk. During the dark period of both SD and LD conditions, Pfr levels rapidly decreased in phyB[S86D] plants due to faster dark reversion. Depletion of Pfr was slower in phyB[WT] or even slower in phyB[S86A] plants. Accordingly, *FT* levels during the night were low in phyB[S86D], but high in phyB[WT] and phyB[S86A]. Taken together, the pattern of *FT* mRNA

accumulation correlated well with the expected Pfr levels in the different lines and conditions.

phyB[Y276H] plants express phyB that constitutively exists in the Pfr form, whereas phyB[C357T] plants produce phyB Pr independent of the light conditions due to impaired binding of the chromophore. phyB[Y276H] plants showed *FT* expression profiles and flowering time identical to those of phyB[S86A] plants, whereas phyB[C357T] plants behaved as the *phyB-9* mutant corroborating the requirement of phyB Pfr for the flowering phenotype of phyB overexpression.

Our data strongly suggested that high levels of phyB Pfr stabilize the CO protein around dusk and during the night. The COP1-SPA ubiquitin ligase complex was shown to play the major role in the regulation of CO protein levels at these times. The four SPA proteins (SPA1-SPA4) redundantly enhance the ubiquitin ligase activity of COP1 via physical interactions. SPA1 and SPA4 were shown to be the primary SPA proteins controlling flowering time. The *cop1* and *spa* mutants flower early especially in SD conditions and have increased levels of CO protein and *FT* mRNA at dusk, but particularly during the night. These phenotypes are qualitatively very similar to those we observed for the phyB overexpressing lines. Therefore, we proposed that phyB Pfr accelerate flowering by partial inhibition of the function of the COP1-SPA complex. It has been demonstrated recently that the Pfr conformer of phyA and phyB binds to SPA1 disrupting the SPA1-COP1 interaction that results in lower activity of COP1 and accumulation of target proteins like HFR1 or HY5. Using yeast two-hybrid assays and light conditions where Pfr levels are limited, we showed that binding efficiency of SPA1 to the wild type or phospho-mutant derivatives of phyB tightly correlated with *FT* mRNA levels measured during the night in the transgenic lines overexpressing the corresponding phyB derivatives. This finding suggests that overexpressed phyB Pfr controls CO protein levels and flowering time by impairing SPA1-COP1 interaction. In contrast to the effect of overexpression, phyB Pfr in wild type plants promotes degradation of CO during the day. Since CO is ubiquitinated and degraded by the proteasome, phyB is expected to positively modulate the function of an ubiquitin ligase other than COP1 during the day.

Our data collectively suggest that the net effect of phyB on CO turnover is determined by the combination of three factors: the time of the day, the level of phyB Pfr and the particular ubiquitin ligase controlled by phyB Pfr. In the first half of the day phyB appears to promote degradation of CO, independent of overexpression. phyB enhances

the function of the unidentified ubiquitin ligase that overrides the effect of inhibition of the COP1-SPA complex. In the second half of the day and around dusk the function of the unidentified ubiquitin ligase is less dominant, but the elevated *FT* levels in the *phyB-9* mutant indicate that this function is not totally absent yet. Overexpression of *phyB* induces rather than reduces *FT* levels indicating the increasing effect of the inhibition of COP1-SPA. In the night, the COP1-SPA complex has the prevailing effect on CO stability, thus *phyB* overexpression results in massive *FT* induction, whereas in wild type plants levels of endogenous Pfr are probably not sufficient to significantly affect the COP1-SPA complex.

In contrast to its role in flowering time determination, the effect of *phyB* on the pace of the clock in continuous red light is proportional to the amount of the protein: *phyB* mutants show long period phenotypes, whereas *phyB* overexpressors display shorter periods. According to the estimated levels of Pfr forms, *phyB*[S86A] and *phyB*[S86D] plants produced shorter and longer periods as compared with *phyB*[WT] plants at lower fluences of red light, but periods were identical in these lines under saturating illumination. Interestingly, periods in *phyB*[S86D] plants matched the periods in *phyB-9* plants at fluence rates lower than $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In contrast, relative hypocotyl length in these two plants became identical at more than one order of magnitude lower fluences of red light. These observations suggest that pace of the clock is much less sensitive to the amount of *phyB* Pfr than the control of hypocotyl elongation.

12. Köszönetnyilvánítás

A dolgozatban bemutatott kísérletek nagy részét a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem el.

Köszönettel tartozom csoportvezetőmnek, Dr. Nagy Ferencnek az anyagi és szellemi támogatásért, valamint a lehetőségért, hogy munkámat a csoportban végezhettem el.

Köszönöm Dr. Vass Imre igazgató úrnak, valamint Dr. Ormos Pál főigazgató úrnak hogy a munkámat lehetővé tették az intézetben.

Legnagyobb köszönettel témavezetőmnek Dr. Kozma-Bognár Lászlónak tartozom, aki irányt mutatott, rengeteg szellemi és gyakorlati segítséget nyújtott mind a disszertáció megírásában, mind a dolgozat alapjául szolgáló publikáció elkészítésében.

Köszönöm Dr. Ádám Évának a munkám során nyújtott támogatást, segítséget és tanácsokat.

Köszönöm Dr. Gyula Péternek a pályafutásom kezdetekor nyújtott gyakorlati és szellemi segítséget.

Köszönöm Dr. Andreas Hiltbrunner-nek az élesztős kísérleti eredményeket.

Köszönöm Dr. Fehér Attilának hogy elvállalta a disszertációm bírálatát.

Köszönöm csoportom valamennyi tagjának az érdeklődést, támogatást és segítséget.

Köszönöm Petőné Jószai Katalin és Szabóné Veres Gabriella asszisztenseknek a kísérletek előkészítésében nyújtott rengeteg segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak (leginkább kisfiamnak és férjemnek) a sok támogatást, türelmet és segítséget.